

**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/11, C12Q 1/68, C12N 9/00, 15/86, A61K 31/70 // C12N 15/52</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/36517</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 22. Juli 1999 (22.07.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/00181 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 14. Januar 1999 (14.01.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 01 153.9      14. Januar 1998 (14.01.98)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> JENNE, Andreas [DE/DE]; Angerweg 12, D-83253 Rimsting (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> IL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR SELECTING RIBOZYMES WHICH ARE CAPABLE OF COVALENTLY MODIFYING THE RIBONUCLEIC ACIDS ON 2'-OH-GROUPS IN TRANS		
<b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR SELEKTION VON RIBOZYMEN, DIE RIBONUCLEINSÄUREN IN TRANS AN 2'-OH-GRUPPEN KOVALENT MODIFIZIEREN KÖNNEN		
<b>(57) Abstract</b>  The invention relates to an in vitro selection method for selecting ribozymes which are capable of covalently modifying the ribonucleic acids on 2'-OH-groups in trans and to the ribozymes obtained using this method. The invention also relates to medicaments containing said ribozymes, said medicaments being preferably used for inhibiting gene expression - for example in gene therapy. The inventive ribozymes can also be used for producing muteins and nuclease-resistant ribonucleic acids, for example ribonuclease-resistant "antisense" oligonucleotides.		
<b>(57) Zusammenfassung</b>  Die vorliegende Erfindung betrifft ein in vitro-Selektionsverfahren, mit dem Ribozyme selektiert werden können, die 2'-OH-Gruppen von Ribonucleinsäuren in trans kovalent modifizieren können. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Ribozyme, die durch dieses Verfahren erhältlich sind. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung diese enthaltende Arzneimittel, die vorzugsweise zur Hemmung der Genexpression - beispielsweise in der Gentherapie - verwendet werden können. Die erfindungsgemäßen Ribozyme können darüber hinaus zur Herstellung von Muteinen und nucleaseresistenten Ribonucleinsäuren - beispielsweise ribonucleaseresistenten "Antisense"-Oligonucleotide - verwendet werden.		

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Verfahren zur Selektion von Ribozymen, die Ribonucleinsäuren  
in trans an 2'-OH-Gruppen kovalent modifizieren können**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein in vitro-Selektionsverfahren, mit dem Ribozyme selektiert werden können, die 2'-OH-Gruppen von Ribonucleinsäuren in trans kovalent modifizieren können. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Ribozyme, die durch dieses Verfahren erhältlich sind. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung derartige Ribozyme enthaltende Arzneimittel, die vorzugsweise zur Hemmung der Genexpression - beispielsweise in der Gentherapie - verwendet werden können. Die erfindungsgemäßen Ribozyme können darüber hinaus zur Herstellung von Muteinen und nucleaseresistenten Ribonucleinsäuren - beispielsweise ribonucleaseresistente "Antisense"-Oligonucleotide - verwendet werden.

Ribozyme sind RNA-Moleküle, die in der Lage sind, chemische Reaktionen zu katalysieren. Der prominenteste Vertreter unter den Ribozymen ist das mechanistisch und strukturell sehr

1 gut charakterisierte Hammerhead-Ribozym, welches die orts-  
spezifische Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen in RNA ka-  
talyisiert. Diese Eigenschaft eröffnet die Möglichkeit, das  
5 Hammerhead-Ribozym gentherapeutisch zu nutzen, indem bei-  
spielsweise durch sequenzspezifische Spaltung einer mRNA die  
Expression eines bestimmten Gens inhibiert wird (Birikh et  
al., Eur. J. Biochem. 245 (1997), 1-6). Bisher gelang dies  
sowohl in Zellkultur (Jones und Sullenger, Nature Biochem.  
10 Vol. 15 (1997), 902-905) als auch in Pflanzen (Yang et al.,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 4861-4865) und Tierex-  
perimenten (Lieber und Kay, J. Virol. 70 (1996), 3153-3158),  
wobei das Ribozym entweder von außen den Zellen zugeführt  
wird (exogene Applikation) oder in den Zellen durch Trans-  
15 kription eines Vektors synthetisiert wird (endogene Applika-  
tion). Generell besitzen somit solche und ähnliche Ribozyme  
ein hohes Potential als Inhibitoren der Genexpression in  
transgenen Tieren und Pflanzen, als Werkzeuge für Wissen-  
schaft und Diagnose, sowie als humane Therapeutika (Burke,  
20 Nature Biotech. Vol. 15 (1997), 414-415; Marschall et al.,  
Cell. Mol. Neurobiol. 14 (1994), 523-538). Ribozyme haben  
dabei mit "Antisense"-Oligonucleotiden das Prinzip gemein,  
auf der Ebene des Gens zu wirken, im Gegensatz zu den mei-  
sten Arzneimitteln, die auf Proteinfunktionen zielen. Aller-  
dings wird den Ribozymen für die genannten Anwendungsberei-  
25 che auf Grund ihrer katalytischen Eigenschaften eine größere  
Rolle beigemessen als den "Antisense"-Oligonucleotiden  
(Woolf, Antisense Res. Dev. 5 (1995), 227-232).

30 Das Repertoire von natürlicherweise vorkommenden Ribozymen  
beschränkt sich auf die Spaltung und Ligation spezifischer  
Phosphodiesterbindungen in Ribonucleinsäuren. In jüngerer  
Zeit jedoch gelang es durch Techniken der "in vitro-Selek-  
tion" (Tuerk und Gold, Science 249 (1990), 505-510; Elling-  
ton und Szostak, Nature 346 (1990), 818-822) nicht nur die  
35 Funktionalität natürlicher Ribozyme zu verbessern, sondern  
darüber hinaus eine Reihe von Ribozymen mit neuen Eigen-  
schaften herzustellen (Pan, Curr. Opin. Chem. Biol. Vol. 1

1 Nr. 1 (1997), 17-25). Durch Anwendung der in vitro-Selektion  
wurden beispielsweise Ribozyme mit RNA-Ligase-Aktivität  
(Bartel und Szostak, Science 261 (1993), 1411-1418), mit Po-  
5 lynucleotid-Kinase-Aktivität (Lorsch und Szostak, Nature 371  
(1994), 31-36) und Peptidyl-Transferase-Aktivität (Zhang und  
Cech, Nature 390 (1997), 96-100) selektiert. Bisher aller-  
dings war es nicht möglich, synthetische Ribozyme zu gene-  
rieren, die RNA-Moleküle sequenzspezifisch an internen 2'-  
10 Hydroxylgruppen modifizieren. Ribozyme mit solchen Eigen-  
schaften könnten, ähnlich den Hammerhead-Ribozymen, in the-  
rapeutischen Verfahren eingesetzt werden und darüber hinaus  
zu interessanten Anwendungen in der modernen Biotechnologie  
führen.

15 Aufgrund des relativ begrenzten katalytischen Spektrums der  
natürlicherweise vorkommenden Ribozyme ist ihre Einsetzbar-  
keit zur Beeinflussung der Genexpression, beispielsweise bei  
therapeutischen Verfahren, begrenzt. Die Wirkung von Ribozy-  
men, die gegenwärtig zur Inhibition der Genexpression gete-  
20 stet werden, ist auf die Spaltung von Ziel-RNAs begrenzt.  
Somit liegt der vorliegenden Erfindung das technische Pro-  
blem zugrunde, Ribozyme bereitzustellen, die in der Lage  
sind, die Genexpression auf andere Art und Weise zu beein-  
25 flußen.

Die Lösung dieses technischen Problems erfolgt durch die Be-  
reitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten  
Ausführungsformen. Es wurde überraschenderweise gefunden,  
30 daß die durch das nachstehend näher beschriebene Selektions-  
verfahren erhältlichen Ribozyme fremde RNA-Moleküle sequenz-  
spezifisch an internen 2'-OH-Gruppen kovalent modifizieren  
können. So modifizierte RNAs sind nicht mehr translatierbar.  
Daher können diese Ribozyme zu einer neuartigen Hemmung der  
35 Genexpression, beispielsweise in der Gentherapie, verwendet  
werden.

1 Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur  
Selektion eines Ribozyms, das 2'-OH-Gruppen von Ribonuclein-  
säuren in trans kovalent modifizieren kann, wobei das Ver-  
fahren durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- 5 (a) Inkubation einer Ribonucleinsäurebibliothek mit einem  
Reaktanden, der mit einer 2'-OH-Gruppe in Ribonuclein-  
säuren reagieren kann,  
(b) Selektion und Isolation von Ribonucleinsäuren, die mit  
dem Reaktanden eine kovalente Bindung eingegangen sind,  
10 (c) Umschreibung in cDNA und Amplifikation der in Schritt  
(b) erhaltenen Ribonucleinsäuren,  
(d) Iteratives Durchlaufen der Schritte (a) bis (c),  
(e) Sequenzbestimmung der selektierten Ribonucleinsäuren,  
(f) Bestimmung der modifizierten 2'-OH-Gruppe innerhalb der  
15 selektierten Ribonucleinsäuren,  
(g) Spaltung der selektierten Ribonucleinsäure in einen Sub-  
stratteil (I) und katalytischen Teil (II = Ribozym), und  
(h) Überprüfung, ob der katalytisch aktive Teil (II) den  
Substratteil in trans kovalent modifizieren kann.  
20

Die für dieses Selektionsverfahren benötigten Teilschritte  
sind dem Fachmann aus der einschlägigen, beispielsweise vor-  
stehend beschriebenen Literatur bekannt. Das Verfahren wird  
nachstehend im Beispiel genau beschrieben.  
25

Unter dem Begriff "kovalent modifizieren" wird in der vor-  
liegenden Erfindung jede beliebige kovalente Modifikation an  
einer 2'-OH-Gruppe einer RNA verstanden. Vorzugsweise han-  
delt es sich um alle Arten von Additions- und Substitutions-  
30 reaktionen, die zur Bindungsbildung unter Beteiligung der  
2'-Hydroxylgruppe führen. Besonders bevorzugt ist in der  
vorliegenden Erfindung die kovalente Modifikation über eine  
Acylierung.

35 Unter dem Begriff "Reaktand" versteht man jedes Molekül, das  
entweder als Ganzes, oder als Teil auf die 2'-OH-Gruppe von  
RNAs übertragen werden kann. Dazu gehören prinzipiell alle  
Verbindungen, die mit Oxyanionen bzw. Hydroxylgruppen kova-

1     lent reagieren. Solche Verbindungen sind beispielsweise Car-  
bonsäurederivate (Ester, Säurehalogenide etc), gespannte  
Ringsysteme (Epoxide etc.), Verbindungen mit Mehrfachbindun-  
5     gen (Arene etc.) und Verbindungen des Typs R-X, mit R = Al-  
kyl oder Aryl und X = Abgangsgruppe (Halogen, Tosyl etc.).  
Ein bevorzugter Reaktand ist Aminosäure-AMP-Ester, wobei es  
sich vorzugsweise um Phenylalanyl-2'-(3')-AMP (Phe-AMP), be-  
sonders bevorzugt um Biotinyl-N-Phe-AMP (Bio-Phe-AMP) han-  
delt.

10     Unter dem Begriff "iteratives Durchlaufen" ist folgendes zu  
verstehen: Um eine Population von katalytisch aktiven Se-  
quenzen anzureichern, müssen die Schritte der "Selektion"  
und "Amplifikation" abwechselnd mehrmals hintereinander  
15     durchgeführt werden. Da es nicht möglich ist, alle unspezi-  
fischen (d.h., nicht-funktionellen) RNAs quantitativ in ei-  
nem einzigen Selektionsschritt von den funktionellen Sequen-  
zen abzutrennen, müssen mehrere Selektionszyklen durchlaufen  
werden. Vorzugsweise werden sovielen Zyklen durchgeführt, bis  
20     keine Anreicherung der gewünschten Aktivität mehr detektiert  
werden kann (in der Regel nach 6 - 20 Zyklen).

25     Die Bestimmung der modifizierten 2'-OH-Gruppe in der Ziel-  
RNA kann grundsätzlich durch folgende Verfahren erfolgen:  
Primer-Extension (Ruskin et al., Cell 38 (1984), 317),  
MALDI-TOF-Sequenzierung mit Exonucleasen (Smirnov et al.,  
Analyt. Biochem. 238 (1996), 19-25), oder wie in Beispiel 1  
beschrieben durch RNase-Sequenzierung.

30     Zur Spaltung der selektierten Ribonucleinsäure in Substrat-  
teil und katalytisch aktiven Teil kann man grundsätzlich wie  
folgt vorgehen: Bei bekannter Stelle der 2'-Modifikation  
wird das ursprünglich selektierte in cis-Ribozym etwa 5 - 10  
35     Basen stromaufwärts oder stromabwärts dieser Position "ge-  
schnitten". Die beiden RNA-Fragmente (Ribozym- und Substrat-  
Teil) werden entweder durch in vitro-Transkription geeigne-  
ter DNA-Matrizen oder durch automatisierte Oligonucleotid-

1 Festphasen-Synthese erzeugt. Das in trans-Ribozym wird anschließend auf seine Fähigkeit hin getestet, das Oligonucleotid-Substrat umzusetzen.

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Ribozyme, die durch das vorstehende und in dem Beispiel beschriebene Verfahren erhältlich sind. In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform ist das Ribozym dadurch gekennzeichnet, daß es die in Figur 6a dargestellte Sekundärstruktur  
10 und Nucleinsäuresequenz von Position 28 bis 136 aufweist, oder eine davon abweichende Sequenz und/oder Sekundärstruktur, wobei diese Abweichungen nicht zum Verlust der ursprünglichen katalytischen Aktivität führen. Diese Abweichungen betreffen die Addition, Deletion und/oder Insertion  
15 von Basen, wobei die ursprüngliche Sequenz zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95 % und mehr bevorzugt zu mindestens 98 % erhalten bleibt. Vorzugsweise bleibt bei diesen eingeführten Änderungen die Sekundärstruktur erhalten. Diese Abweichungen betreffen vor allem auch die Sequenz von Position  
20 28 bis 40 und/oder 68 bis 84 in Figur 6a, die entsprechend der Sequenz der gewählten Ziel-RNA (Substrat) gewählt werden muß, d.h. sie muß ausreichend Komplementarität zu der Ziel-RNA aufweisen, um diese binden und modifizieren zu können. Dabei sollten die in Figur 6a gezeigten "Loops" vorzugsweise  
25 erhalten bleiben.

Vorzugsweise sollte man bei bekannter Ziel-RNA diese beim Design der Selektion berücksichtigen, wie nachfolgend erläutert. Im Amplifikationsschritt der in vitro-Selektion werden  
30 aktive Sequenzen revers transkribiert. Wie nachstehend erwähnt, führen 2'-Modifikationen in der Regel dazu, daß das reverse Transkriptase-Enzym keine DNA-Abschriften herstellen kann, aufgrund eines Stopps an der modifizierten Position. Somit werden bevorzugt Ribozyme selektiert, die innerhalb  
35 der 3'-Primerbindungsstellen 2'-modifiziert werden, da der 3'-Primer als Initiatorsequenz für die Elongation extern der reversen Transkriptionsreaktion zugeführt wird. Für die



1 Einführung der Modifikation innerhalb einer bestimmten Ziel-  
Sequenz würde man folglich selbige als Primersequenz wählen.

5 Der Fachmann kann anhand von allgemein bekannten Techniken  
Variationen in die Sequenz/Struktur des Ribozyms einfügen  
(beispielsweise durch Anwendung erneuter Selektionsrunden  
des erfindungsgemäßen Selektionsverfahrens, in vitro-Mutage-  
nese etc.), die auch zu einem Ribozym führen können, dessen  
10 katalytische Aktivität erhöht ist oder das eine andere Sub-  
stratspezifität aufweist. Soll beispielsweise das in Figur  
6a dargestellte Ribozym eine RNA binden und modifizieren,  
die nicht die Sequenz des Substrats von Position 137 bis 164  
aufweist, so muß die zur Hybridisierung benötigte Sequenz  
des Ribozyms beispielsweise zwischen den Positionen 28 bis  
15 40 und/oder 68 bis 84 so geändert werden, daß es ein Sub-  
strat mit der gewünschten Sequenz binden und modifizieren  
kann. Um beispielsweise die Spezifität des Ribozyms dahinge-  
hend zu verändern, daß auch ein anderer, als der in der Se-  
lektion verwendete Reaktand auf die Ziel-RNA übertragen  
20 wird, kann das Selektionsverfahren erneut angewandt werden,  
wobei günstigerweise die partiell randomisierte Ribozymse-  
quenz der neuen Selektion zugrunde gelegt wird. Gemäß  
Standardverfahren kann der Fachmann auch testen, ob ein ver-  
ändertes Ribozym noch die gewünschten Eigenschaften auf-  
weist, beispielsweise mittels der im Beispiel erläuterten  
25 Verfahren.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine DNA-Sequenz,  
30 die das erfindungsgemäße Ribozym codiert. Die erfindungsge-  
mäßigen Nucleinsäuremoleküle können auch in einen Vektor inse-  
riert werden. Somit umfaßt die vorliegende Erfindung auch  
diese Ribozyme codierende DNA enthaltende Vektoren. Die Be-  
zeichnung "Vektor" bezieht sich auf ein Plasmid (z.B. pUC18,  
pBR322, pBlueScript), auf ein Virusgenom oder ein anderes  
35 geeignetes Vehikel. In einer bevorzugten Ausführungsform ist  
das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül im Vektor mit regu-  
latorischen Elementen funktionell verknüpft, die dessen

1 Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen  
Wirtszellen erlauben. Solche Vektoren enthalten neben den  
regulatorischen Elementen, beispielsweise einem Promotor,  
5 typischerweise einen Replikationsursprung und spezifische  
Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten  
Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen für  
die Expression in Prokaryonten, beispielsweise E.coli, zäh-  
10 len der lac-, trp-Promotor oder T7-Promotor, und für die Ex-  
pression in Eukaryonten der AOX1- oder GAL1-Promotor in  
Hefe, und der CMV-, SV40-, RSV-40-Promotor, MMTV-LTR-Promo-  
tor, MLV-LTR-Promotor (Adenovirus (VA1), Herpes simplex  
(HSV); "immediate-early" 4/5 Promotor, CMV- oder SV40-Enhan-  
15 cer für die Expression in tierischen Zellen. Weitere Bei-  
spiele für geeignete Promotoren sind der Metallothionein I-  
und der Polyhedrin-Promotor. Zu geeigneten Vektoren zählen  
beispielsweise auf T7 basierende Expressionsvektoren für die  
Expression in Bakterien (Rosenberg et al., Gene 56 (1987),  
20 125), pMSXND für die Expression in Säugerzellen (Lee und  
Nathans, J. Biol. Chem. 263 (1988), 3521), und von Baculovi-  
rus abgeleitete Vektoren für die Expression in Insektenzel-  
len.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der die erfindungs-  
25 gemäßen Nucleinsäuremoleküle enthaltende Vektor ein Virus,  
beispielsweise ein Adenovirus, Vaccinia-Virus oder "adeno-  
associated-virus" (AAV), die bei einer Gentherapie von Nut-  
zen sind. Besonders bevorzugt sind Retroviren. Beispiele für  
geeignete Retroviren sind MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder  
30 GaLV.

Allgemeine, auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur  
Konstruktion von Expressionsvektoren, die die erfin-  
dungsgemäßen Ribozyme und geeignete Kontrollsequenzen ent-  
halten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen bei-  
35 spielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische  
Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie  
beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning: A

1 Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory  
Press, Cold Spring Harbor NY (1989) beschrieben sind.

5 Promotor-Ribozym codierende DNA kann direkt oder mit Hilfe  
eines Virus in die Zelle eingebracht werden. Beim direkten  
Verfahren wird die DNA beispielsweise über ein poly-L-Lysin  
an ein Fab-Fragment gebunden und von den das entsprechende  
10 Antigen tragenden Zellen absorbiert (Ferkol et al., J. Clin.  
Invest. 95 (1995), 493-502). Bei Verwendung eines Virus wird  
die in ihn verpackte DNA mittels des Virus in die Zelle  
eingeschleust. Wird die Promotor-Ribozym-Einheit 5'- und 3'-  
seitig von viralen "inverted terminal repeats" flankiert,  
15 kann diese Einheit in das Genom integrieren (Goodman et al.,  
Blood 84 (1994), 1492-1500). Ist dies nicht der Fall, so  
liegt die DNA episomal vor (Flotte et al., Am. J. Respir.  
Cell. Mol. Biol. 11 (1994), 517-521). Beispielsweise handelt  
es sich bei dem Virus um Adenoviren (Brody und Crystal, Ann.  
20 N.Y. Acad. Sci. 716 (1994), 90-101), "adeno-associated-vi-  
rus" (AAV) in Kombination mit kationischen Liposomen (Philip  
et al., Mol. Cell. Biol. 14 (1994), 2411-2418), Adenovirus  
in Kombination mit Retroviren (Adams et al., J. Virol. 69  
(1995), 1887-1894), Sendai-Viren (von der Leyen et al.,  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (1995), 1137-1141), Retro-  
25 viren (Rettinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91  
(1994), 1460-1464) oder Vaccinia-Viren (Lee et al., Cancer  
Res. 54 (1994), 3325-3328).

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die vorstehend be-  
30 schriebenen Ribozyme enthaltende Wirtszellen. Zu diesen  
Wirtszellen zählen Bakterien, Hefe, Insekten-, Pflanzen- und  
Tierzellen, vorzugsweise Säugerzellen. Bevorzugte Säugerzel-  
len sind CHO-, VERO-, BHK-, HeLa-, COS-, MDCK, 293- und  
WI38-Zellen. Verfahren zur Transformation dieser Wirtszel-  
35 len, zur phänotypischen Selektion von Transformanten und zur  
Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle unter  
Verwendung der vorstehend beschriebenen Vektoren sind auf  
dem Fachgebiet bekannt.

1

5

10

15

Die vorliegende Erfindung umfaßt außerdem ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Ribozyms, wobei es sich um enzymatische oder chemische Verfahren handeln kann. Beispielsweise kann die DNA-Sequenz, die das Ribozym codiert, in einen in einem prokaryontischen Wirt replizierbaren Vektor, unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors, beispielsweise eines SP6-, T3- oder T7-Promotors, insertiert werden, was nach Gewinnung des amplifizierten Plasmids aus dem Wirt die in vitro-Transkription der das Ribozym codierenden DNA-Sequenz und die Gewinnung von Ribozym-RNA erlaubt. Alternativ kann das Ribozym durch ein chemisches Verfahren, beispielsweise ein auf der Phosphoramiditreaktion basierendes Verfahren (Sproat et al., Nucleosides & Nucleotides 14 (1995), 255-273), in großen Mengen synthetisiert werden.

20

25

30

35

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Ribozym, das so modifiziert ist, daß eine Resistenz gegenüber Nucleasen erhalten wird. Dadurch erhöht sich die Verweilzeit und damit die Wirksamkeit des Ribozyms am Zielort, beispielsweise in bestimmten Zellen eines Patienten. Außerdem können dadurch die zu applizierende Menge des Ribozyms und ggf. damit in Zusammenhang stehende Nebenwirkungen erniedrigt werden.

Beispiele für solche Modifikationen sind die Substitution der 2'-OH-Gruppen der Ribose, durch 2'-H-, 2'-O-Methyl-, 2'-O-Allyl-, 2'-Fluor- oder 2'-Amino-Gruppen (Paolella, et al., EMBO J. 11 (1992), 1913-1919, und Pieken et al., Science 253 (1991), 314-317) oder die Modifizierung von Phosphodiesterbindungen, wobei beispielsweise ein oder zwei Sauerstoffatome gegen Schwefel ausgetauscht werden (Phosphorthioat bzw. Phosphordithioat; Eckstein, Ann. Rev. Biochem. 54 (1985), 367-402, und Beaton et al., in: Eckstein, F. (Hrsg.) Oligonucleotides and analogues - A practical approach - Oxford, JRL Press (1991), 109-135) bzw. gegen eine Methylgruppe (Methylphosphonat; Miller, ebenda, 137-154). Weitere

1     Modifikationen umfassen die Konjugation der RNA mit poly-L-  
Lysin, Polyalkylderivaten, Cholesterin oder PEG. Vorzugs-  
weise enthalten die erfindungsgemäßen Ribozyme mindestens  
5     eine der vorstehend beschriebenen Phosphatmodifikationen  
und/oder mindestens eine der vorstehend beschriebenen Ribo-  
semodifikationen.

10     Die Transkription der das erfindungsgemäße Ribozym codieren-  
den DNA-Sequenzen führt zur Synthese von Ribozymen, die die  
Translation der gewünschten Ziel-RNA hemmen können. Damit  
eignen sich sowohl die das Ribozym codierenden DNA-Sequenzen  
als auch die erfindungsgemäßen Ribozyme selbst als Arznei-  
mittel, vorzugsweise zur Hemmung der Genexpression in vitro  
15     oder in vivo.

Die erfindungsgemäßen Ribozyme stellen nicht nur eine Alter-  
native zu den erwähnten Hammerhead-Ribozymen dar, sondern  
zeigen bei bestimmten Applikationen Vorteile:

20     - Die Inhibition der Genexpression ist in transgenen (d.h.  
das Ribozym exprimierenden) Organismen durch Gabe des Re-  
aktanden steuerbar. Zum Beispiel kann ein transgener Orga-  
nismus ein Ribozym produzieren, das befähigt ist, mit ei-  
nem externen Reaktanden eine bestimmte mRNA an einer be-  
25     stimmten internen OH-Gruppe zu modifizieren. Erst durch  
Gabe des Reaktanden, beispielsweise in einem bestimmten  
Entwicklungsstadium, entfaltet das Ribozym seine katalyti-  
sche Aktivität und die Expression des Zielgens wird ver-  
hindert ("induzierbarer Knock-out").

30     - 2'-modifizierende Ribozyme könnten als sequenzspezifische  
Gensonden verwendet werden, wenn auf die Ziel-RNA ein  
leicht nachweisbares Markermolekül übertragen wird (z.B.  
Fluorescein oder wie im Beispiel 1 Biotin, wobei mit Bio-  
35     tin markierte Moleküle über Phosphatase-konjugiertes Avi-  
din nachgewiesen werden können).

- 1 - 2'-modifizierende Ribozyme eignen sich insbesondere zur  
Bekämpfung von Retroviren, da die eingeführte Modifikation  
das Umschreiben des viralen RNA-Genoms in DNA behindert  
oder gar unmöglich macht (Lorsch et al., Nucl. Acids Res.  
5 23 (1995), 2811-2814). Auch in diesem Fall ist die Wirkung  
des Ribozyms durch Gabe des Reaktanden steuerbar.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit außerdem Arzneimit-  
tel, die die das erfindungsgemäße Ribozym codierende DNA  
10 oder einen, das erfindungsgemäße Ribozym codierende DNA um-  
fassenden Vektor, ggf. in Kombination mit einem pharmazeu-  
tisch verträglichen Träger, enthalten.

15 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende  
Erfindung Arzneimittel, die das erfindungsgemäße Ribozym  
enthalten.

Abhängig davon, ob das Ribozym selbst oder die das Ribozym  
codierende DNA-Sequenz, ggf. in einem rekombinanten Vektor,  
20 appliziert wird, kann die Verabreichung auf unterschiedli-  
chen Wegen erfolgen. Im ersten Fall erfolgt die Verabrei-  
chung beispielsweise nach Kopplung der 3'-Enden der Ribozyme  
an Poly-(L-Lysin) über Standardverfahren, wie sie beispiels-  
weise von Leonetti et al., in: Cohn and Moldave (Hrsg.),  
25 Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 44  
(1993), 143-146 (New York, Academic Press) beschrieben sind,  
durch Mikroinjektion nach dem Fachmann bekannten Verfahren  
(siehe z.B. Leonetti et al., PNAS USA 88 (1991), 2702-2706),  
nach Einkapselung in Liposomen, beispielsweise durch das von  
30 Farhood (Farhood et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 716 (1994) 23-  
34) beschriebene Verfahren, nach Verpackung in Phagen  
(Picket und Peabody, Nucleic Acids Res. 21 (1993), 4621-  
4626), oder durch Peptid-vermittelte Einschleusung in die  
Zellen, wie sie beispielsweise von Derossi et al., J. Biol.  
35 Chem. 269 (1994), 10444-10450, beschrieben wurde. Desweite-  
ren kann durch Koppeln der Promotor-Ribozym-DNAs an spezifi-  
sche Antikörper oder andere geeignete Liganden eine gezielte

1   Einschleusung des Ribozyms oder der Promotor-Ribozym codie-  
renden DNAs in gewünschte Organe, Gewebe oder Zellen er-  
reicht werden (Leonetti et al., PNAS USA 87 (1990), 2448-  
2451). Die Verabreichung erfolgt beispielsweise systemisch  
5   oder lokal, intravenös, intramuskulär, intraperitoneal, via  
Katheter oder durch Inhalation von Aerosolen.

Im zweiten Fall erfolgt die Verabreichung beispielsweise  
über eine Transfektion, beispielsweise über dem Fachmann be-  
10   kannte Standardverfahren wie Calciumpräzipitation, Elektro-  
poration, das DEAE-Dextran-Verfahren, über kationische Lipo-  
somen, beispielsweise Lipofectin, Polyamine, das Trans-  
ferrin-Polylysin-Verfahren oder Verknüpfung der DNA oder des  
rekombinanten Vektors an einen spezifischen Antikörper oder  
15   einen anderen Liganden. Die Verabreichung kann wie vorste-  
hend beschrieben erfolgen.

Die Formulierung des wirksamen Bestandteils kann ggf. in  
Kombination mit pharmazeutisch verträglichen Trägern, bei-  
20   spielsweise einem Verdünnungsmittel, Excipienten, Netzmit-  
tel, grenzflächenaktiven Mittel, Bindemittel etc., abhängig  
von der Art der Verabreichung, erfolgen.

Der wirksame Bestandteil wird in einer geeigneten Dosis ver-  
25   abreicht, die vom Patienten selbst, der Art und Schwere der  
Erkrankung etc. abhängt. Die erforderliche Dosismenge kann  
vom Fachmann routinemäßig bestimmt werden, wobei auch be-  
rücksichtigt wird, ob die Verabreichung als Einzeldosis er-  
folgt oder, über einen bestimmten Zeitraum verteilt, durch  
30   mehrfache Dosen.

Als potentielle Reaktanden dienen in der Zelle vorliegende  
Verbindungen, vorzugsweise Aminosäure-Adenylate, Acetylcho-  
lin, Acetyl-Coenzym A, zyklisches AMP und Nucleosid-Triphos-  
35   phate und andere Zellmoleküle, die mit 2'-OH-Gruppen reagie-  
ren können. Andererseits kann auf Ribozyme selektiert wer-  
den, die einen in der Zelle nicht vorhandenen Reaktanden

1     benötigen. Diese Ribozyme bieten den Vorteil, daß die Reak-  
tion von außen - durch Zugabe des Reaktanden - gesteuert  
5     werden kann. Bevorzugt verwendet man bereits im Selektions-  
verfahren geeignete Reaktanden, die bekannterweise gut ver-  
träglich und leicht applizierbar sind, sowie gegebenenfalls  
von Zellen leicht aufgenommen werden, d.h. permeabel für  
Zellmembranen sind.

10    Die erfindungsgemäßen Ribozyme können auch Anwendung in der  
Gentherapie finden, wenn die Genexpression aufgrund von  
falschem Spleißen der RNA negativ beeinflußt wird. Durch die  
von den erfindungsgemäßen Ribozymen eingeführten 2'-OH-Modi-  
fikationen werden beispielsweise Reaktionen an (falschen)  
15    Positionen unterdrückt, die eine freie Hydroxylfunktion  
benötigen.

Eine weitere Ausführungsform betrifft die erfindungsgemäßen  
Ribozyme zur Herstellung von Muteinen. Da die Ribozyme auch  
20    die Übertragung einer biotinylierten Aminosäure von dem be-  
schriebenen modifizierten Substrat (28mer-Phe-Bio) auf AMP  
(reverse Reaktion) katalysieren, kann diese Aktivität ge-  
nutzt werden, um tRNAs an deren 3'-Ende mit nicht-cognaten  
Aminosäuren, oder anderen Molekülen, gemäß folgender Reak-  
tion zu beladen:

25

Ribozym

Aminosäure-AMP + tRNA     —————>   aminoacylierte-tRNA

30    Mit Hilfe so hergestellter "falsch beladener" tRNAs können  
somit gezielt Proteinmutanten durch in vitro-Translation ge-  
mäß Standardverfahren hergestellt werden (Mendel et al.,  
Ann. Rev. Biophys. Biomol. Stmc. 24 (1995), 435-462).

35    Besonders interessant sind solche Ribozyme für neue Anwen-  
dungen in der kombinatorischen Chemie (Roberts und Stostak,  
PNAS USA 94 (1997), 12297-12302), da durch sie Substrate



1 ortsspezifisch in Proteine eingeführt werden können, welche  
nicht durch den genetischen Code determiniert sind.

5 Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich die Verwen-  
dung der erfindungsgemäßen Ribozyme zur Herstellung  
nucleaseresistenter Ribonucleinsäuren, da gezeigt werden  
konnte, daß solcherart modifizierte RNAs resistent gegen  
10 Nucleasen sind. Diese könnten somit ebenfalls Anwendung in  
der Gentherapie, beispielsweise als "Antisense"-Oligonucleo-  
tide, finden, wenn eine hohe Halbwertszeit der angewandten  
RNAs wünschenswert ist.

15 Die erfindungsgemäßen Ribozyme bzw. diese codierenden Vekto-  
ren können auch zur Herstellung transgener Pflanzen verwen-  
det werden, beispielsweise um durch Hemmung der Expression  
bestimmter Gene gewünschte Stoffwechselprodukte anzureichern  
oder eine Virusresistenz zu erzeugen. Somit betrifft die  
vorliegende Erfindung auch transgene Pflanzen.

20 Um die Expression der Ribozym-DNA-Sequenzen in pflanzlichen  
Zellen zu gewährleisten, können diese im Prinzip unter die  
Kontrolle eines beliebigen in pflanzlichen Zellen funktiona-  
len Promotors gestellt werden. Die Expression der besagten  
25 DNA-Sequenzen kann generell in jedem Gewebe einer aus einer  
transformierten erfindungsgemäßen Pflanzenzelle regenerier-  
ten Pflanze und zu jedem Zeitpunkt stattfinden, bevorzugt  
jedoch findet sie in solchen Geweben statt, in denen eine  
veränderte Genexpression von Vorteil entweder für das Wachs-  
tum der Pflanze oder für die Bildung von Inhaltsstoffen in-  
30 nerhalb der Pflanze ist. Geeignet erscheinen von daher vor  
allem Promotoren, die eine spezifische Expression in einem  
bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt  
der Pflanze oder aber in einem bestimmten Organ der Pflanze  
sicherstellen. Geeignete Promotoren sind dem Fachmann be-  
35 kannt.

1 Die DNA-Sequenzen, die die oben beschriebenen Ribozyme co-  
dieren, sind vorzugsweise außer mit einem Promotor mit DNA-  
Sequenzen verknüpft, die eine weitere Steigerung der  
5 Transkription gewährleisten, beispielsweise sogenannte  
Enhancer-Elemente. Derartige Regionen können von viralen Ge-  
nen oder geeigneten pflanzlichen Genen gewonnen oder synthe-  
tisch hergestellt werden. Sie können homolog oder heterolog  
zum verwendeten Promotor sein. Vorteilhafterweise werden die  
10 Ribozym-DNA-Sequenzen ferner mit 3'-DNA-Sequenzen verknüpft,  
die die Termination der Transkription gewährleisten. Derar-  
tige Sequenzen sind bekannt und beschrieben, beispielsweise  
die des Octopinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

15 Die Ribozym-DNA-Sequenzen, die erfindungsgemäß in pflanzli-  
chen Zellen eingeführt und exprimiert werden, liegen in den  
erfindungsgemäßen Pflanzenzellen vorzugsweise stabil ins Ge-  
nom integriert vor.

20 Bei den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen kann es  
sich grundsätzlich um Zellen jeder beliebigen Pflanzenspe-  
zies handeln. Von Interesse sind sowohl Zellen monocotyler  
als auch dicotyler Pflanzenspezies, insbesondere Zellen  
stärkespeichernder, ölspeichernder oder landwirtschaftlicher  
25 Nutzpflanzen, wie z.B. Roggen, Hafer, Gerste, Weizen, Kar-  
toffel, Mais, Reis, Raps, Erbse, Zuckerrübe, Sojabohne, Ta-  
bak, Baumwolle, Sonnenblume, Ölpalme, Wein, Tomate usw.

Der Transfer der DNA-Moleküle, die Ribozym-DNA-Sequenzen  
30 enthalten, erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden,  
vorzugsweise unter Verwendung von Plasmiden, insbesondere  
solchen Plasmiden, die eine stabile Integration des DNA-Mo-  
leküls in das Genom transformierter Pflanzenzellen gewähr-  
leisten, beispielsweise binären Plasmiden oder Ti-Plasmiden  
des *Agrobacterium tumefaciens*-Systems. Neben dem *Agrobacte-*  
35 *rium*-System kommen andere Systeme zur Einführung von DNA-Mo-  
lekülen in pflanzlichen Zellen in Frage, wie z.B. das soge-  
nannte biolistische Verfahren oder aber die Transformation

1 von Protoplasten (vgl. Willmitzer L. (1993), Transgenic  
Plants, Biotechnology 2; 627-659 für eine Übersicht). Ver-  
fahren zur Transformation monocotyler und dicotyler Pflanzen  
5 sind in der Literatur beschrieben und sind dem Fachmann be-  
kannt.

Die Figuren zeigen:

10 **Fig. 1:** Verschiedene nucleophile Positionen innerhalb der  
RNA-Bibliothek können mit der Aminoacyl-Esterfunk-  
tion von 1 (Biotin-Phe-AMP) reagieren: Der Angriff  
der Aminofunktion (1) führt zur Peptidbindungsbil-  
dung. Durch Reaktion interner (2) oder terminaler  
15 (3) Hydroxylgruppen mit 1 entstehen RNA-Ami-  
noacylester.

**Fig. 2:** Anreicherung aminoacylierter RNA im Laufe der Se-  
lektion. Am Fuß der Graphik sind das Verhältnis von  
RNA zu Substrat 1 sowie die Inkubationszeiten des  
20 jeweiligen Zyklus angegeben. In Zyklen 1 - 7 wurde  
eine 5'-aminofunktionalisierte RNA-Bibliothek (H<sub>2</sub>N-  
Cys-Cit-SS-RNA) verwendet, während in allen folgen-  
den Zyklen ohne gekoppeltes Dipeptid selektiert  
wurde. In den ersten sechs Selektionszyklen betrug  
25 der Anteil an aminoacylierter RNA weniger als 0,01  
%. Selektionszyklus 10 wurde unter mutagenen Bedin-  
gungen durchgeführt, um die Evolution von Ami-  
noacyltransferasen höherer Aktivität zu ermögli-  
chen.

30

**Fig. 3:** Sequenzen der selektierten Clone ohne konstante  
Primerbindungsstellen. Mutationen innerhalb indivi-  
dueller Sequenzen sind unterstrichen.

35

1 **Fig. 4:** Vorgeschlagene Sekundärstruktur des Clon 11-Ribo-  
zyms. Durch Deletionsanalyse wurde gezeigt, daß nur  
die eingerahmte Sequenz für die Katalyse benötigt  
wird.

5 **Fig. 5:** Die katalytische Aktivität des Clon 11-Ribozyms ist  
abhängig von der Magnesiumionen-Konzentration. Die  
Reaktionen wurden bei Raumtemperatur mit 5  $\mu\text{M}$  ra-  
dioaktiv markierter Clon 11-RNA und 25  $\mu\text{M}$  1 in Se-  
lektionspuffer durchgeführt, wobei die  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzen-  
tration auf den angegebenen Wert (x-Achse) einge-  
stellt wurde. Der Reaktionsmischung wurden Aliquots  
zu sechs verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Zur  
Quantifizierung der Ribozymaktivität koppelte man  
15 die entstandene aminoacylierte RNA an Streptavidin-  
Agarose.

20 **Fig. 6:** (a) Vorgeschlagene Sekundärstrukturen für den Kom-  
plex aus Ribozym 28-136 und Substrat Oligonucleotid  
(Position 137 - 3'-Ende). Die aminoacylierte Posi-  
tion C147 ist gekennzeichnet.  
(b) RNase-Sequenzierung des "Wild-Typ Substrat Oli-  
gonucleotids" (links) und des aminoacylierten 28-  
mer Oligonucleotids (rechts). Die Unterschiede im  
25 Sequenzierungsmuster zeigen, daß die Basenposition  
C147 durch das Ribozym 28-136 modifiziert wurde.  
Das aminoacylierte Substrat wurde wie folgt er-  
zeugt: 10  $\mu\text{M}$  Ribozym 28-136 wurden mit wenigen  
Picomolen 5'-markiertem 28 mer-Oligonucleotid und 1  
30 mM Biotin-Phe-AMP 1 in Selektionspuffer inkubiert.  
Nach 120 Minuten präzipitierte man die RNA und kop-  
pelte sie an Streptavidin-Agarose. Nicht-bioti-  
nylierte RNAs wurden durch Waschen entfernt, wäh-  
rend biotinylierte Oligonucleotide mit 2 M 2-Mer-  
captoethanol oder Biotin im Überschuß von der  
35 Streptavidin-Matrix eluiert wurden. Die Sequenzie-  
rung mit RNasen erfolgte nach einem Protokoll des

1           Herstellers (Pharmacia). Man verwendete folgende  
RNasen: T1 für die Spur G, RNase U2 für A, RNase  
Phy M für A/U und RNase B. cereus für U/C. OH: Par-  
5           tieller alkalischer Verdau des Oligonucleotids. R:  
Unbehandelte Kontroll-RNA. Die Fragmente wurden  
elektrophoretisch auf einem 20%igen Polyacrylamid-  
Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie visuali-  
siert. Das Resultat wurde unter Verwendung von 3'-  
10          [<sup>32</sup>P]-markiertem 28-mer Oligonucleotid reprodu-  
ziert.

**Fig. 7:** Repräsentative MALDI-TOF-Analyse des durch Ribozym-  
katalyse erzeugten Reaktionsproduktes (28-mer-Phe-  
Biotin). 5  $\mu$ M Ribozym 28-136 wurden mit 1  $\mu$ M 28-mer  
15          Oligonucleotid und 1 mM Biotin-Phe-AMP 1 in Sele-  
ktionspuffer für 2 Stunden inkubiert. Die RNA wurde  
anschließend präzipitiert, in Wasser resuspendiert  
und ohne weitere Behandlung in ein Dynamo-Massen-  
spektrometer eingespritzt. Das Molekulargewicht des  
20          modifizierten 28 mer-Substrates wurde als Durch-  
schnittswert verschiedener Messungen in Gegenwart  
des unmodifizierten (nicht-reagierten) 28-mer-Oli-  
gonucleotids als internem Standard bestimmt. Der  
Massenunterschied zwischen nicht-reagiertem und  
25          reagiertem 28 mer-Oligonucleotid wurde mit  
 $\Delta_{\text{gemessen}} = 370,5$  Da kalkuliert. Der theoretische  
Massenunterschied zwischen 28-mer und 28-mer-Phe-  
Biotin beträgt  $\Delta_{\text{theoretisch}} = 372,5$  Da. Die Abwei-  
30          chung von 2 Da, relativ zum gemessenen Wert, liegt  
innerhalb der Fehlergrenzen für die Meßgenauigkeit  
des Massenspektrometers.

**Fig. 8:** Kinetische Charakterisierung der intramolekularen  
Reaktion, die vom Clon 11-Ribozym katalysiert wird.  
35          Die Anfangsgeschwindigkeiten  $v_0$  der Reaktion sind  
gegen verschiedene Konzentrationen von Substrat 1  
aufgetragen. Die Michaelis-Menten-Parameter  $K_m$  und

$k_{cat}$  erhielt man durch "Curve fitting" der Gleichung  $v_0 = (RNA)_0 \cdot [1] \cdot k_{cat} / (K_m + [1])$  unter Verwendung von KaleidaGraph (Abelbeck Software). Einsatz: Exponentialfunktion der Aminoacylierungsreaktion mit 5  $\mu$ M Clon 11-RNA und 0,5 mM Biotin-Phe-AMP 1. Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{obs}$  wurden mittels der Gleichung  $[P]_t = [RNA] - [RNA] \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t)$  bestimmt, wobei  $[P]_t$  = Konzentration der aminoacylierten RNA zum Zeitpunkt  $t$ ;  $[RNA]$  = Konzentration von Clon 11-RNA.

**Fig. 9:** Analyse der durch das Ribozym 28-136 katalysierten Rückreaktion (28-mer-Phe-Biotin + AMP): 5'-[<sup>32</sup>P]markiertes 28-mer-Phe-Biotin wurden über Affinitätschromatographie an Streptavidin-Agarose gereinigt, mit 2 M 2-Mercaptoethanol eluiert und in Selektionspuffer resuspendiert. (a) Repräsentativer Reaktionsverlauf der Rückreaktion sowie Negativkontrolllexperimente bei 2,0 mM AMP.  $t_0$ ,  $t_{90'}$  und  $t_{5h}$  zeigen die Abnahme von 28-mer-Phe-Biotin-Oligonucleotid bei gleichzeitiger Zunahme des deacylierten Reaktionsproduktes (nicht modifiziertes 28-mer). In Abwesenheit von AMP bzw. Ribozym [ $t_{5h}$  (ohne AMP) und  $t_0$  (ohne AMP) bzw.  $t_{5h}$  (ohne Rib.) und  $t_0$  (ohne Rib.)] wurde keine Änderung der 28-mer-Phe-Biotin-Konzentration gefunden. (b) Reaktionsverlauf der Rückreaktion als Exponentialfunktion bei 2 mM AMP, 5  $\mu$ M Ribozym 28-136, und 5 nM 28-mer-Phe-Biotin.

**Fig. 10:** Reaktionsverlauf der durch das Ribozym 28-136 katalysierten Rückreaktionen (28-mer-Phe-Biotin + ATP und 28-mer-Phe-Biotin + tRNA<sup>fMet</sup>): 5'-[<sup>32</sup>P] markiertes 28-mer-Phe-Biotin wurden über Affinitätschromatographie an Streptavidin-Agarose gereinigt, mit 2 M 2-Mercaptoethanol eluiert und in Selektionspuffer resuspendiert. 5 nM 28-mer-Phe-Biotin

1 wurden mit 10 mM ATP bzw. 0,2 mM tRNA<sup>fMet</sup> und 5 µM  
Ribozym 28-136 in Selektionspuffer inkubiert. Nach  
den angegebenen Zeiten wurden der Reaktionsmischung  
5 Aliquots entnommen und auf einem 20 %igen Poly-  
acrylamidgel analysiert. (Repräsentativer Reakti-  
onsverlauf der Rückreaktion bei 2,0 mM AMP). t<sub>0,5h</sub>  
bis t<sub>17h</sub> zeigen die Abnahme von 28-mer-Phe-Biotin-  
Oligonucleotid bei gleichzeitiger Zunahme des  
10 deacylierten Reaktionsproduktes, d.h. nicht-modifi-  
ziertem 28-mer.

Fig. 11: Ribozym-katalysierte Beladung von tRNA-3'-Enden mit  
Substraten R. (a) Das Ribozym (fett gezeichnet) ka-  
15 talyisiert den Transfer von R-CO, einem Teil des Re-  
aktanden R-AMP, unter Abspaltung von Adenosin-5'-  
Monophosphat auf sich selbst (auf eine interne 2'-  
Hydroxylfunktion). (b) Das acylierte Ribozym trans-  
feriert den Ester R-CO auf das 3'-Ende einer tRNA  
(terminales Adenosin ist gezeigt). Diese Reaktion  
20 entspricht im Prinzip der Rückreaktion - statt AMP  
besetzt allerdings das terminale Adenosin einer  
tRNA die Bindungstasche für den Reaktanden. (c) Das  
freigesetzte Ribozym kann erneut mit dem Reaktan-  
den-R-AMP reagieren ("Multiple turnover"). Für R =  
25 Biotin-Phe und Ribozym = Clon 11-Ribozym wurde ge-  
zeigt, daß die vorgeschlagene Reaktion im Prinzip  
möglich ist (vgl. Fig. 10). Das Clon 11-Ribozym  
fungiert dabei als generelle Aminoacyl-tRNA-Syn-  
thase, da die Spezifität für den Reaktanden vor-  
nehmlich durch den AMP-Teil bestimmt ist (vgl. Bei-  
30 spiel 1f, Inhibition durch AMP).

Das nachstehende Beispiel erläutert die Erfindung.

1

**Beispiel 1:**

5

**In vitro-Selektion von RNA-Molekülen mit Ester-Transferase-Aktivität****(a) Einleitung**

10

15

20

25

30

Durch Screening von kombinatorischen Nucleinsäure-Bibliotheken können RNA- oder DNA-Moleküle mit spezifischen Bindungseigenschaften und neuartigen katalytischen Funktionalitäten isoliert werden. Die dazu angewandte Technik wird in der Literatur oftmals als "in vitro-Selektion" bezeichnet. Jüngste Ergebnisse auf diesem Gebiet haben gezeigt, daß Ribozyme und Desoxyribozyme befähigt sind, eine Vielzahl von chemischen Reaktionen zu katalysieren (Pan, Curr. Opin. Chem. Biol. Vol. 1 Nr. 1 (1997), 17-25). Nachfolgend wird die in vitro-Selektion und Charakterisierung eines neuartigen Ribozyms beschrieben, das die Übertragung des N-biotinylierten Aminoacylesters von N-biotinyliertem Phenylalanyl-2'(3')-adenosin-5'-ester (Biotin-Phe-AMP) auf eine interne 2'-Hydroxylgruppe innerhalb der Ribozymsequenz katalysiert. Die katalysierte Reaktion wird im folgenden als "Estertransfer" oder "Aminoacylierung" bezeichnet. Es wurde gezeigt, daß die Aminoacylierung kompetitiv durch den AMP-Teil des Acyldonor-Substrates (Biotin-Phe-AMP) inhibiert wird, was dafür spricht, daß vom Ribozym eine Substrat-spezifische Bindungstasche gebildet wird. Durch "Ribozym-Engineering" gelang die Herstellung einer Ribozymvariante (Ribozym 28-136), welche den Aminoacyltransfer auf ein externes Oligonucleotid katalysiert (im folgenden "in trans-Reaktion" genannt):

Ribozym 28-136

Oligonucleotid + Biotin-Phe-AMP → Oligonucleotid-Phe-Bio + AMP

35

Ferner wurde gezeigt, daß das Ribozym 28-136 auch die Deacylierung des Oligonucleotids (d.h. die Rückreaktion) mit hoher Effizienz beschleunigt. Ersetzte man dabei AMP durch eine tRNA, erfolgte die Deacylierung des Oligonucleotids un-



1 ter Aminoacylierung des tRNA-3'-Endes. Das hier beschriebene  
Ribozytm erweitert somit das Repertoire von RNA-Katalyse auf  
Ribozytme, die befähigt sind, den Aminoacyl-Transfer von RNA-  
3'-Enden auf interne 2'-Positionen und revers zu katalysie-  
5 ren.

(b) Herstellung der DNA- und RNA-Bibliotheken

10 Die RNA-Bibliothek für den ersten Selektionszyklus wurde  
durch in vitro-Transkription einer synthetischen DNA-Biblio-  
thek mit folgender Sequenz hergestellt: 5'-GGG AGC TCT GCT  
CTA GCC AC-N30-GAC GGT TAG GTC GCA C-N30-GTG AAG GAG TGT C-  
N30-GGC ACC TGC CAC GAG TC-3' (N steht für eine äquimolare  
15 Mischung der Nucleotide A, C, G, T; bei den unterstrichenen  
Nucleotiden handelt es sich um ein zu 30 % randomisiertes  
Citrullin-Aptamer-Motiv (Famulok, J. Am. Chem. Soc. 116  
(1994), 1698-1706). Die DNA-Bibliothek wurde durch automati-  
sierte Oligonucleotid-Festphasensynthese hergestellt. Die  
20 Sequenzen der verwendeten Primer waren TCT AAT ACG ACT CAC  
TAT AGG GAG CTC TGGC TCT AGC CAC sowie GAT CCC TCG TGG CAG  
GTG CC (Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase ist unter-  
strichen). Die PCR-Amplifikation der DNA-Bibliothek und die  
in vitro-Transkription mittels T7-RNA-Polymerase erfolgten  
25 nach molekularbiologischen Standardprotokollen (Abelson  
Hrsg., Meth. in Enzymology 267 (1996), 275-436). Eine genaue  
Beschreibung findet sich in: A. Jenne, Diplomarbeit aus dem  
Fachbereich Biochemie an der LMU München, 1995. Um die in  
den ersten 7 Selektionszyklen verwendete 5'-Amino-modifi-  
zierte RNA-Bibliothek (H<sub>2</sub>N-Cit-Cys-SS-RNA) herzustellen,  
30 wurde die in vitro-Transkription in Gegenwart eines 8-fachen  
Überschusses an Guanosin-5'-phosphorthioat (Burgin und Pace,  
EMBO J. 9 (1990), 4111-4118) gegenüber den restlichen  
Nucleotidtriphosphaten durchgeführt. Die resultierende 5'-  
thiolmodifizierte RNA-Bibliothek wurde dann mit einem 50-mo-  
35 laren Überschuß an thiopyridyl-aktiviertem NH<sub>2</sub>-Cit-  
Cys(thipy)-COOH in Kopplungspuffer (5 mM EDTA, 25 mM Na-PO<sub>4</sub>,  
pH 7,7) für 20 Minuten zur Reaktion gebracht. Die Vollstän-

1 digkeit der Reaktion wurde spektrometrisch durch Messung des  
freigesetzten Thiopyridons bei 343 nm bestimmt. Die RNA-Bi-  
2 bliothek wurde dann mit Ethanol präzipitiert und an-  
3 schließend zweimal mit je 150 µl 70 % Ethanol gewaschen. In  
5 den Selektionszyklen 7 - 13 wurde mit einer 5'-unmodifizier-  
ten RNA-Bibliothek (ohne eingeführte Thio- / Aminofunktion)  
selektiert, da das gekoppelte Dipeptid nachweislich keinen  
Einfluß auf die angereicherte Aminoacyltransferase-Aktivität  
10 hatte.

(c) Synthese der Verbindungen Biotin-Phe-AMP und NH<sub>2</sub>-Cit-  
Cys(thipy)-COOH

15 Die Synthese der in der Selektion verwendeten Verbindungen  
NH<sub>2</sub>-Cit-Cys(thipy)-COOH und N-biotinyliertem Phenylalanyl-  
2'(3')-adenosin-5'-ester (Biotin-Phe-AMP) sind beschrieben  
in: A. Jenne, Diplomarbeit an der LMU München aus dem Fach-  
bereich Biochemie, 1995. Beide Verbindungen wurden NMR- und  
20 massenspektroskopisch charakterisiert.

(d) Durchführung der in vitro-Selektion

25 Die in vitro-Selektion wurde mit einer RNA-Bibliothek von  
etwa  $5 \times 10^{14}$  verschiedenen Sequenzen durchgeführt. Die RNA  
wurde bei 94°C für 2 Minuten in Magnesium-freiem Selektions-  
puffer (200 mM NaCl, 50 mM K-MOPS, pH 7,4) denaturiert. An-  
schließend wurde die Konzentration an Mg<sup>2+</sup>-Ionen im Puffer  
auf 5 mM eingestellt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die  
30 Transesterifizierungsreaktion wurde durch Zugabe von N-bio-  
tinyliertem Phenylalanyl-2'(3')-adenosin-5'-ester (Biotin-  
Phe-AMP) initiiert. Der Reaktionsansatz wurde dann bei Raum-  
temperatur inkubiert und nach den in Figur 2 angegebenen  
Zeiten durch eine Sephadex G-50-Säule (Pharmacia, ca. 10 ml)  
35 filtriert, um überschüssiges Biotin-Phe-AMP abzutrennen.  
Diejenigen Fraktionen, die RNA enthielten, wurden mit Etha-  
nol präzipitiert, in 500 µl Streptavidin-Kopplungspuffer  
(150 mM NaCl, 25 mM Na-PO<sub>4</sub>, pH 6,9) resuspendiert und mit

1 250  $\mu$ l gequollener Streptavidin-Agarose (Pierce) für 30 Mi-  
nuten inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend in eine Po-  
lyethylen-Säule (Biorad) transferiert und mit je 20 Säulen-  
5 volumina Waschpuffer W1 (1 M NaCl, 5 mM EDTA, 25 mM K-MOPS,  
pH 7,4), Waschpuffer W2 (4 M Harnstoff, 5 mM EDTA, mit K-  
MOPS auf pH 7,4 eingestellt), Waschpuffer W3 (3 M Guanidini-  
umchlorid, 5 mM EDTA) und schließlich mit Wasser gewaschen,  
um nicht-biotinylierte RNA-Moleküle abzutrennen. RNA-Mole-  
küle, die über den Biotinteil an Streptavidin-Agarose gekop-  
10 pelt waren, wurden unter Spaltung der Biotin-Streptavidin-  
Wechselwirkungen mit 0,2 M 2-Mercaptoethanol (Selektions-  
zyklen 1-6) bzw. 2 M 2-Mercaptoethanol (Selektionszyklen 7-  
13) eluiert. Die eluierten RNA-Moleküle wurden mit Ethanol  
präzipitiert, revers transkribiert, PCR-amplifiziert und für  
15 den nächsten Selektionszyklus durch in vitro-Transkription  
wieder in RNA umgeschrieben (Famulok, J. Am. Chem. Soc. 116  
(1994), 1698-1706). In den ersten sechs Selektionszyklen  
wurden 1 mM Biotin-Phe-AMP mit 20  $\mu$ M [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP markierter  
aminofunktionalisierter RNA für 20 Stunden inkubiert. In  
20 späteren Selektionszyklen wurde der Selektionsdruck durch  
verkürzte Inkubationszeiten und verringerte Konzentrationen  
an RNA bzw. Biotin-Phe-AMP erhöht (vergl. Fig. 2). Der  
Prozentsatz an Transesterasen (Ribozyme, die den Aminoacyl-  
transfer katalysieren) wurde über den Anteil an radioaktiv  
25 markierter RNA bestimmt, der an Streptavidin-Agarose gebun-  
den hatte. In Selektionszyklus 10 wurde die PCR-Amplifika-  
tion unter mutagenen Bedingungen durchgeführt, um die Evolu-  
tion noch aktiverer Ribozyme zu ermöglichen (Cadwell und  
Joyce, PCR Meth. Appl. 2 (1992) 28-33). Die an Transestera-  
30 sen angereicherte RNA-Bibliothek wurde nach Selektionszyklus  
13 cloniert und sequenziert (Famulok, J. Am. Chem. Soc. 116  
(1994), 1698-1706). Allgemeine Anleitungen zu den beschrie-  
benen Selektionsschritten finden sich in Abelson Hrsg.,  
Meth. in Enzymology 267 (1996), 275-436.

1 (e) Selektierte Ribozym-Sequenzen

5 Man erhielt Sequenzen von 27 Clonen, die in drei Sequenzfamilien (I, II, III) unterteilbar sind (siehe Fig. 3). Mitglieder einer Familie unterscheiden sich nur durch Punktmutationen, wahrscheinlich auf Grund der zusätzlich eingeführten Diversität in Selektionszyklus 10. Clon 11 aus der Sequenzfamilie III wurde einer genaueren Analyse unterzogen.

10 (f) Deletionsanalyse des Clons 11-Ribozyms, Magnesiumabhängigkeit und Inhibition der Reaktion

15 Durch Deletionsanalyse gelang es, das Voll-Länge-Clon-11-Ribozym auf ein katalytisch aktives Minimalmotiv einzuschränken (siehe Fig. 4). Um die minimalen Sequenzanforderungen des Ribozymes zu bestimmen, wurden verschiedene verkürzte Versionen des Clon-11-Ribozyms hergestellt. Alle getesteten RNA-Konstrukte erhielt man durch in vitro-Transkription von  
20 entsprechenden DNA-Fragmenten, die wiederum durch "nested-PCR" unter Verwendung geeigneter Primer erzeugt wurden. In Figur 5 ist die Abhängigkeit der Ribozym-katalysierten Aminoacylierung von der Konzentration an Magnesiumionen dargestellt. Durch weitere Analyse konnte gezeigt werden, daß das  
25 Clon-11-Ribozym kompetitiv durch AMP gehemmt wird ( $K_i = 4,7$  mM), wohingegen Biotin nur ein sehr schwacher Inhibitor der Reaktion ist.

30 (g) Bestimmung der Reaktionsstelle im Clon-11-Ribozym und Herstellung einer in-trans-Ribozymvariante

Zur Bestimmung der Reaktionsstelle (= aminoacylierte 2'-Hydroxylfunktion innerhalb der RNA-Sequenz) wurde wie folgt verfahren:

- 35 1. Partieller RNase T1-Verdau des aminoacylierten Clon-11-Ribozyms zur Ermittlung des Sequenzbereiches, in dem die Reaktion erfolgt.

- 1 2. Spaltung des Clon-11-Ribozyms in einen Substrat-Teil  
(28-mer-Oligonucleotid; Basenposition 137-164) und in  
einen katalytischen Teil (Ribozym 28-136; Basenposition  
28-136) auf Grundlage der unter Punkt 1. erhaltenen Da-  
5 ten.
3. RNase-Sequenzierung des aminoacylierten 28-mer-Oligo-  
nucleotids zur exakten Bestimmung der Reaktionsstelle.
4. Massenspektroskopische Untersuchung und Modifikations-  
analyse der Ribozym-katalysierten Reaktion zur Bestäti-  
10 gung der Reaktionsstelle.

Zu 1.) Um herauszufinden, welche 2'-Hydroxylfunktion im  
Clon-11-Ribozym aminoacyliert wurde, inkubierte man 5'- bzw.  
15 3'-[<sup>32</sup>P]-markiertes Ribozym mit Biotin-Phe-AMP und immobili-  
sierte die biotinylierten RNAs an Streptavidin-Agarose.  
Nachdem man die nicht-aminoacylierten RNAs durch Waschen der  
Affinitätsmatrix entfernt hatte, wurden die gekoppelten ami-  
noacylierten RNAs partiell an Guanosinresten mit RNase T1  
20 verdaut. Die aus dieser Behandlung resultierenden nicht-ami-  
noacylierten RNA-Fragmente wurden durch Spülen der Affini-  
tätsmatrix gesammelt, wohingegen die auf der Agarose ver-  
bleibenden aminoacylierten Fragmente mit 2 M 2-Mercaptoetha-  
nol in der Hitze eluiert und separat aufgefangen wurden.  
25 Beide Fraktionen (die aminoacylierten bzw. die nicht-ami-  
noacylierten Fragmente) wurden anschließend auf einem dena-  
turierenden 20% Polyacrylamidgel analysiert. Die Analyse er-  
gab, daß sich die Reaktionsstelle innerhalb der 3'-Primerre-  
gion (zwischen dem 3'-Ende und der Position 137) befindet,  
30 weil aminoacylierte Fragmente im Gegensatz zu nicht-ami-  
noacylierten Fragmenten im Gel stärker retardiert werden, d.  
h. langsamer wandern.

Zu 2.) Zur exakten Bestimmung der Reaktionsstelle spaltete  
man das ursprünglich selektierte Clon-11-Ribozym in einen  
35 Substrat-Teil (28-mer-Oligonucleotid; Basenposition 137-164)  
und in einen katalytischen Teil (Ribozym 28-136; Basenposi-  
tion 28-136). Die vorgeschlagene Sekundärstruktur des Kom-  
plexes aus Ribozym 28-136 und dem Oligonucleotid-Substrat

1 ist in Figur 6a gezeigt. Bei Inkubation des Ribozyms 28-136  
und Biotin-Phe-AMP konnte ein signifikanter Anteil des ver-  
wendeten 28-mer-Oligonucleotids an Streptavidin-Agarose im-  
mobilisiert werden, was eindeutig zeigte, daß das Ribozym  
5 28-136 die Aminoacylierung des Oligonukleotids katalysiert.

Zu 3.) Um zu bestimmen welche 2'-Hydroxylfunktion innerhalb  
des 28-mer-Oligonucleotids reagiert hatte, wurde das ami-  
noacylierte 28-mer-Oligonucleotid mit basenspezifischen  
RNasen sequenziert. Das Ergebnis ist in Figur 6b gezeigt.  
10 Das Sequenzierungsmuster für das aminoacylierte und nicht-  
aminoacylierte Oligonucleotid ist vom 3'-Ende bis zur Posi-  
tion C147 identisch. An Position C147 zeigt das nicht-ami-  
noacylierte 28-mer-Oligonucleotid die erwartete Bande in der  
U/C Spur (Kreis in Fig. 6b), während keine Bande bei dem  
15 aminoacylierten 28-mer-Oligonucleotid zu finden ist (Käst-  
chen in Fig. 6b). Die beobachtete Nucleaseresistenz an Posi-  
tion C147 für das aminoacylierte 28-mer-Oligonucleotid ist  
offensichtlich eine Folge der 2'-Veresterung. Die Sequenzie-  
rungsbanden, die den Positionen 148-164 zugeordnet werden  
20 können, weisen für das aminoacylierte Oligonucleotid eine  
reduzierte Gelmobilität auf (relativ zum nicht-aminoacylier-  
ten Oligonucleotid).

Zu 4.) Das MALDI-TOF-Massenspektrum der in-trans-Aminoacy-  
lierung und die in Tabelle II zusammengefaßte Analyse mit  
25 modifizierten 28-mer-Oligonucleotiden beweisen zweifelsfrei,  
daß die 2'-OH-Gruppe an Position C147 die atomare Position  
der Aminoacylierung ist.

30 (h) Kinetische Analyse der Ribozym-katalysierten Aminoacy-  
lierung

Sowohl der Voll-Länge-Clon-11, als auch die unter (f) und  
35 (g) beschriebenen Ribozymvarianten wurden kinetisch charak-  
terisiert. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der  
intramolekularen Aminoacylierungen sind in Tabelle I zusam-  
mengefaßt. Die Michaelis-Menten-Parameter für die vom Voll-

Länge-Clon-11 katalysierte Reaktion wurden bestimmt mit  $k_{cat} = 0,04 \text{ min}^{-1}$  und  $K_m = 119 \text{ } \mu\text{M}$  (siehe Fig. 8). Bei der in-trans-Reaktion (Aminoacylierung eines 28-mer Oligonucleotids mit Biotin-Phe-AMP durch das Ribozym 28-136) wurden sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion untersucht. Die Quantifizierung der reversen Reaktion ist in Fig. 9 dargestellt. Die Analyse ergab, daß das Gleichgewicht der Reaktion mit einem  $\log K$  von etwa -6 stark auf Seiten der Edukte (28-mer und Biotin-Phe-AMP) liegt.

**Tabelle I**  
Geschwindigkeitskonstanten der intramolekularen Aminoacylierung von verkürzten Clon 11-Konstrukten

Clon 11 Konstrukt (Nucleotid-Grenzen)	$k_{obs} \text{ [h}^{-1}\text{]}^{\#}$
1-164	$1,8 \pm 0,4$
16-164	$2,7 \pm 0,2$
28-164	$5,6 \pm 0,1$
35-164 <sup>S</sup>	n.d.*
38-164 <sup>S</sup>	$3,6 \pm 0,3$
43-164	0
48-164	0
1-160	0
1-154	0
1-145	0
38-160	0
38-154	$1,0 \pm 0,4$
38-145	0

<sup>#</sup> Reaktionsbedingungen: 5  $\mu\text{M}$  RNA wurden mit 50  $\mu\text{M}$  1 in Selektionspuffer (12,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden der Reaktionsmischung Aliquots entnommen und an Streptavidin-Agarose gekoppelt. Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{obs}$  wurden mittels der Gleichung  $[P]_t = [\text{RNA}] - [\text{RNA}] \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t)$  bestimmt, wobei  $[P]_t$  = Konzentration der aminoacylierten RNA zum Zeitpunkt  $t$ ;  $[\text{RNA}]$  = Konzentration von Clon 11-RNA.

\* Die Reaktion verlief zu langsam, um  $k_{\text{obs}}$  zu berechnen.  
 § Die Werte für  $k_{\text{obs}}$  dieser Konstrukte wurden dreifach bestimmt. Die Aktivitäten der anderen Clone wurden in Doppelbestimmungen gemessen. Die Länge der Clone wurde durch Analyse mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestätigt.

Tabelle II

Geschwindigkeitskonstanten der intermolekularen Aminoacylierung unter Verwendung verschiedener 28-mer Oligonucleotid-Substrate.

RNA	2'-Modifikation	Base <sub>147</sub>	$k_{\text{obs}}$ [min <sup>-1</sup> ]
28	OH	C	$0,018 \pm 5 \cdot 10^{-4}$
28-dC	H	C	0
28-OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C	0
28-NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	C	0
28-U	OH	U	$0,023 \pm 1,6 \cdot 10^{-3}$

Reaktionsbedingungen: 5  $\mu\text{M}$  Ribozym 28-136 wurden mit 10 nM modifiziertem 28-mer Oligonucleotid-Substrat und 1 mM 1 in Selektionspuffer (12,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) inkubiert.

#### Ribozym-Kinetiken

Alle Aminoacylierungsreaktionen wurden bei Raumtemperatur in Selektionspuffer bei einer  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration von 12,5 mM durchgeführt. Ribonucleinsäuren wurden nach Standardprotokollen (Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2nd ed. CSHL-Press, Cold Spring Harbor) am 5'-Ende [<sup>32</sup>P]-markiert. Intramolekulare Reaktionen wurden in 100  $\mu\text{l}$  Volumina mit den in Figur 8 und Tabelle I angegebenen Konzentrationen von Ribozym und 1 durchgeführt. Den Reaktionsansätzen wurden zu 8 verschiedenen Zeiten 10 bis 15  $\mu\text{l}$ -Aliquots entnommen. Nach Ethanol-fällung wurden die aminoacylierten RNAs gemäß Herstellerprotokoll (Pierce) an Streptavidin-Agarose gekoppelt, indem man die resuspendierten Proben 30 Minuten mit 50  $\mu\text{l}$  gequollener



1 Affinitätsmatrix inkubierte. Die Streptavidin-Agarose wurde  
anschließend in ein Spinfilter-Reaktionsgefäß (Millipore)  
überführt und gründlich mit den denaturierenden Puffern W2  
5 und W3 gewaschen. Zu diesem Zweck zentrifugierte man das Re-  
aktionsgefäß für 1 Minute bei 12 000 g. Der Anteil an ami-  
noacylierter RNA wurde durch Messung der Radioaktivität be-  
stimmt. Dazu wurden sowohl der Durchfluß (Waschfraktionen)  
als auch die Streptavidin-Agarose im Scintillationszähler  
10 (Beckman) quantifiziert. Die Anfangsgeschwindigkeiten der  
Reaktionen wurden aus den erhaltenen Meßdaten durch "Curve  
fitting" berechnet (vgl. Fig. 8). Intermolekulare Reaktionen  
wurden in 25 µl-Volumina durchgeführt. Konzentrationen der  
Hinreaktion: [Ribozym 28-136] = 5,0 µM, [28-mer] = 20 nM und  
15 [1] = 0,2, 0,5, 1,0, 2,5, und 5,0 mM. Konzentrationen der  
Rückreaktion: [Ribozym 28-136] = 5,0 µM, [28-mer-Phe-Biotin]  
= 5 nM, und [AMP] = 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, und 10,0 mM.  
Zu 10 verschiedenen Zeiten wurden 2 µl-Aliquots entnommen,  
wobei die Reaktion durch Zugabe von 5 µl PAGE Puffer (9,0 M  
20 Harnstoff, 20 mM EDTA) und Kühlung auf -80°C gestoppt wurde.  
Die so erhaltenen Proben wurden anschließend auf einem  
20%igen Polyacrylamidgel analysiert und am Phosphorimager  
(Molecular Dynamics) ausgewertet (vgl. Fig. 9a und 10). Die  
Werte für  $k_{\text{obs}}$  wurden mit Hilfe dieser Daten durch "Curve  
25 fitting" bestimmt (vgl. Fig. 9b). Die Gleichgewichtskon-  
stante K der intermolekularen Reaktion wurde berechnet nach:

$$K = \frac{[28\text{merPheBio}] \times [\text{AMP}]}{[28\text{mer}] \times [\text{BioPheAMP}]}$$

30 Inhibitionsstudien wurden mit 0,045, 0,45, 2,25, 4,5 und  
11,25 mM AMP bzw. Biotin, 11 µM Ribozym 28-164 und 45 µM  
Substrat 1 durchgeführt. Zu fünf verschiedenen Zeiten wurden  
dem Reaktionsansatz Aliquots entnommen und wie für die in-  
tramolekulare Kinetik beschrieben analysiert. Die Werte der  
35

1     Inhibitionskonstanten  $K_i$  berechnet man nach  $k_{\text{obs}} =$   
    $k_0/(1+[I]/K_i)$ , mit  $k_{\text{obs}}$  = beobachtete Geschwindigkeitskon-  
   stante,  $k_0$  = Geschwindigkeit der nicht-inhibierten Reaktion,  
5      $[I]$  = Inhibitorkonzentration, und  $K_i$  = Konzentration bei  
   halbmaximaler Inhibition.

10

15

20

25

30

35

1

## P a t e n t a n s p r ü c h e

- 5 1. Verfahren zur Selektion eines Ribozyms, das 2'-OH-Gruppen von Ribonucleinsäuren in trans kovalent modifizieren kann, wobei das Verfahren durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:
- 10 (a) Inkubation einer Ribonucleinsäurebibliothek mit einem Reaktanden, der mit einer 2'-OH-Gruppe in Ribonucleinsäuren reagieren kann,
- (b) Selektion und Isolation von Ribonucleinsäuren, die mit dem Reaktanden eine kovalente Bindung eingegangen sind,
- 15 (c) Umschreibung in cDNA und Amplifikation der in Schritt (b) erhaltenen Ribonucleinsäuren,
- (d) Iteratives Durchlaufen der Schritte (a) bis (c),
- (e) Sequenzbestimmung der selektierten Ribonucleinsäuren,
- 20 (f) Bestimmung der modifizierten 2'-OH-Gruppe innerhalb der selektierten Ribonucleinsäuren,
- (g) Spaltung der selektierten Ribonucleinsäure in einen Substratteil (I) und katalytischen Teil (II = Ribozym),
- 25 (h) Überprüfung, ob der katalytisch aktive Teil (II) den Substratteil in trans kovalent modifizieren kann.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die 2'-OH-Gruppe des Substratteils acyliert wird.
- 30 3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der Donor für den auf die 2'-OH-Gruppe des Substratteils zu übertragenden Aminosäureteil Biotinyl-N-Phenylalanyl-2'(3')-Adenosin-5'-monophosphat (Bio-Phe-AMP) ist.
- 35 4. Ribozym, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3.

- 1 5. Ribozym nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet daß es  
(a) die in Figur 6a durchgestellte Sekundärstruktur und  
Nucleinsäuresequenz von Position 28 bis 136 auf-  
weist, oder  
5 (b) eine von (a) abweichende Sequenz und/oder Sekundär-  
struktur aufweist, wobei diese Abweichungen nicht  
zum Verlust der ursprünglichen katalytischen Aktiv-  
tität führen.
- 10 6. DNA-Sequenz, das Ribozym nach Anspruch 4 oder 5 codie-  
rend.
- 15 7. Vektor, eine für ein Ribozym nach einem der Ansprüche 1  
bis 5 codierende DNA-Sequenz enthaltend.
- 20 8. Vektor nach Anspruch 7, wobei die DNA-Sequenz mit regu-  
latorischen Elementen funktionell verknüpft ist, die die  
Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen  
Wirtszellen erlauben.
9. Vektor nach Anspruch 7 oder 8, der ein RNA-Virus ist.
10. Vektor nach Anspruch 9, der ein Retrovirus ist.
- 25 11. Wirtszelle, einen Vektor nach einem der Ansprüche 7 bis  
10 enthaltend.
- 30 12. Wirtszelle nach Anspruch 11, die ein Bakterium, eine  
Hefe-, Insekten-, Pflanzen- oder Tierzelle ist.
13. Wirtszelle nach Anspruch 12, die eine Säugerzelle ist.
- 35 14. Verfahren zur Herstellung des Ribozyms nach Anspruch 4  
oder 5, das ein enzymatisches oder chemisches Verfahren  
ist.

- 1 15. Arzneimittel, enthaltend des Ribozym nach Anspruch 4  
oder 5, die DNA nach Anspruch 6 oder den Vektor nach  
einem der Ansprüche 7 bis 10.
- 5 16. Arzneimittel nach Anspruch 15 zur Hemmung der Genexpres-  
sion oder zur Bekämpfung von Retroviren in vitro oder in  
vivo.
- 10 17. Ribozym nach Anspruch 4 oder 5, DNA nach Anspruch 6 oder  
Vektor nach einem der Ansprüche 7 bis 10 zur Verwendung  
als sequenzspezifische Gensonde.
- 15 18. Ribozym nach Anspruch 4 oder 5, DNA nach Anspruch 6 oder  
Vektor nach einem der Ansprüche 7 bis 10 zur Herstellung  
nucleaseresistenter Ribonucleinsäuren oder zur Herstel-  
lung transgener Pflanzen.
- 20 19. Verwendung des Ribozyms nach Anspruch 4 oder 5, der DNA  
nach Anspruch 6 oder des Vektors nach einem der Ansprü-  
che 7 bis 10 zur Herstellung eines Medikaments zur Hem-  
mung der Genexpression oder zur Bekämpfung von Retrovi-  
ren in vivo oder in vitro, zur Herstellung nucleaseresi-  
stenter Ribonucleinsäuren oder transgener Pflanzen oder  
als sequenzspezifische Gensonde.
- 25 20. Ribozym, erhältlich durch das Verfahren nach einem der  
Ansprüche 1 bis 4, wobei nur die Schritte (a) bis (f)  
durchgeführt werden.
- 30 21. Ribozym nach Anspruch 20 zur Verwendung als Ribozym, das  
tRNA-3'-Enden acyliert.
- 35 22. Ribozym nach Anspruch 20 zur Verwendung als Aminoacyl-  
tRNA-Synthetase.

Fig. 1

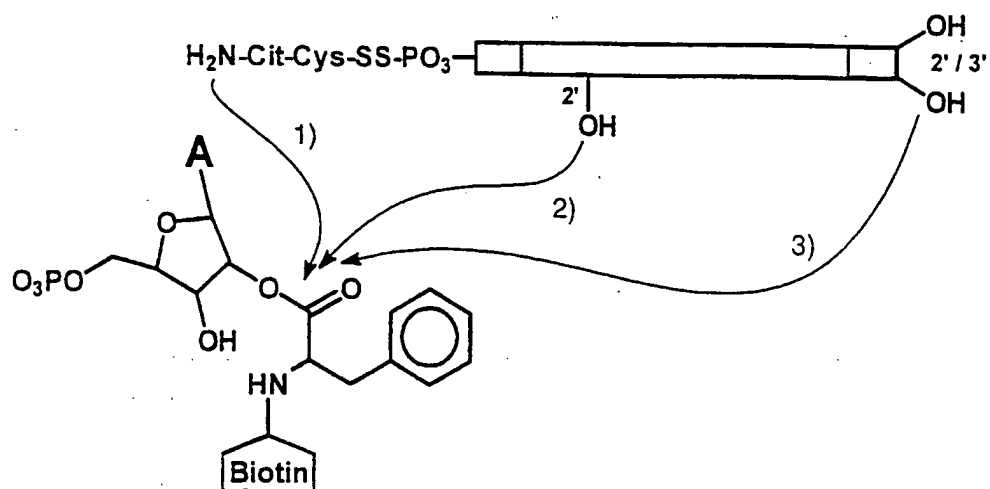


Fig. 2

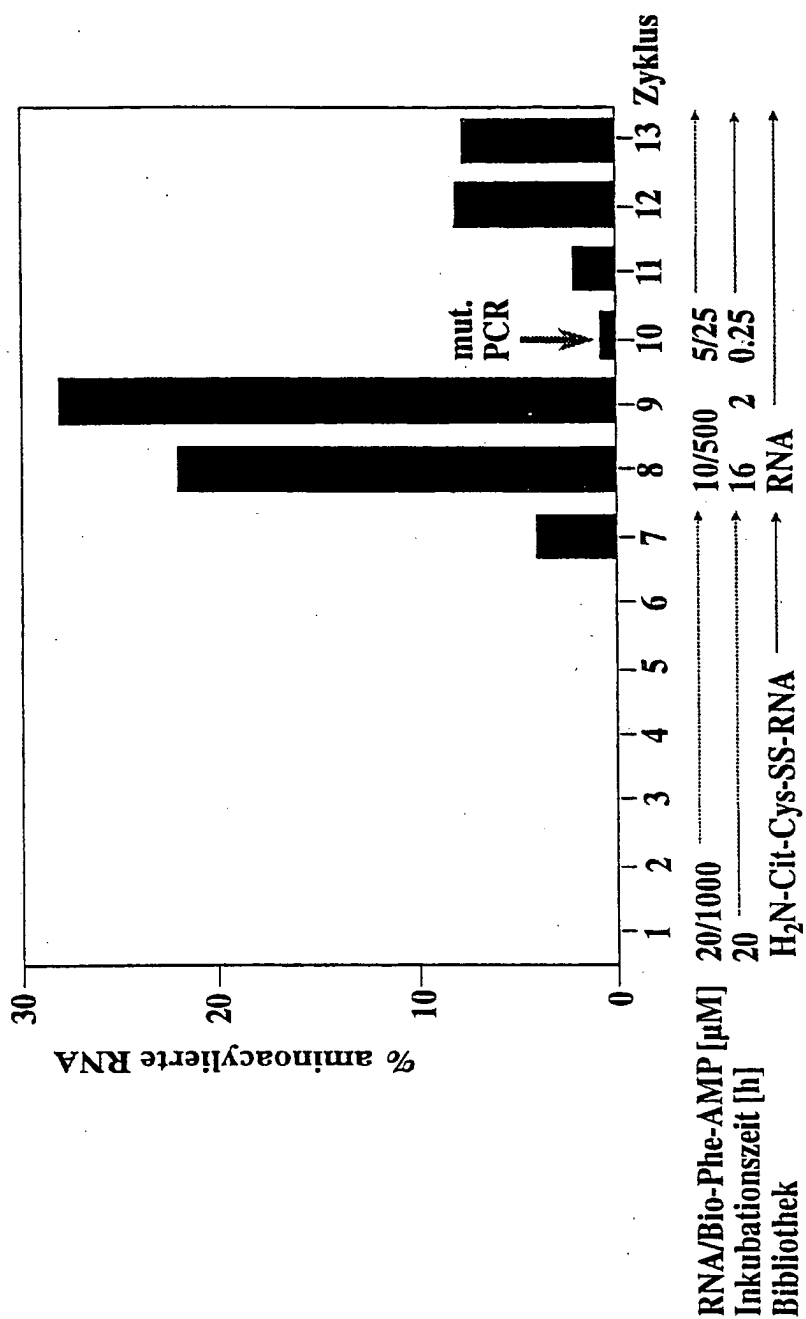


Fig. 3

Klasse I			kobs (h <sup>-1</sup> )
Klon	Sequenz		
3	CGCGCTTAGTGGCGAAGCTCGGATATCGTTTATTTATTTGTGAGCTCGAGGGTCATAAACC GGATGAGTATCCAAATGGGAGTCAATGAGTGTGTTGTTTCCCATGTATCATCGCGGGAATCTTC	2.2 ± 0.3	
6	CGCGCTTTGTGGCGAAGCTCTATATATTTTATTTGTGAGCTCGAGGGTCATAAACC GGATGAGTATCCAAATGGGAGTCAATGAGTGTGTTGTTTCCCATGTATCATCGCGGGAATCTTC		
9	CGCGCTTTGTGGCGAAGCTCCAAATATCGTTTATTTATTTGTGAGCTCGAGGGTCATAAACC GGATGAGTATCCAAATGGGAGTCAATGAGTGTGTTGTTTCCCATGTATCATCGCGGGAATCTTC		
10	CGCGCTTTGTGGCGAAGCTCCAAATATCGTTTATTTATTTGTGAGCTCGAGGGTCATAAACC GGATGAGTATCCAAATGGGAGTCAATGAGTGTGTTGTTTCCCATGTATCATCGCGGGAATCTTC		
17	CGCGCTTTGTGGCGAAGCTCCAAATATCGTTTATTTATTTGTGAGCTCGAGGGTCATAAACC GGATGAGTATCCAAATGGGAGTCAATGAGTGTGTTGTTTCCCATGTATCATCGCGGGAATCTTC		
18	CGCGCTTTGTGGCGAAGCTCCAAATATCGTTTATTTATTTGTGAGCTCGAGGGTCATAAACC GGATGAGTATCCAAATGGGAGTCAATGAGTGTGTTGTTTCCCATGTATCATCGCGGGAATCTTC	1.9 ± 0.3	
23	CGCGCTTTGTGGCGAAGCTCCAAATATCGTTTATTTATTTGTGAGCTCGAGGGTCATAAACC GGATGAGTATCCAAATGGGAGTCAATGAGTGTGTTGTTTCCCATGTATCATCGCGGGAATCTTC		
25	CGCGCTTTGTGGCGAAGCTCCAAATATCGTTTATTTATTTGTGAGCTCGAGGGTCATAAACC GGATGAGTATCCAAATGGGAGTCAATGAGTGTGTTGTTTCCCATGTATCATCGCGGGAATCTTC		
28	CGCGCTTTGTGGCGAAGCTCCAAATATCGTTTATTTATTTGTGAGCTCGAGGGTCATAAACC GGATGAGTATCCAAATGGGAGTCAATGAGTGTGTTGTTTCCCATGTATCATCGCGGGAATCTTC		
29	CGACCTTTGTGGCGAAGCTCCAAATATCGTTTATTTATTTGTGAGCTCGAGGGTCATAAACC GGATGAGTATCCAAATGGGAGTCAATGAGTGTGTTGTTTCCCATGTATCATCGCGGGAATCTTC		
36	CGCGCTTTGTGGCGAAGCTCCAAATATCGTTTATTTATTTGTGAGCTCGAGGGTCATAAACC GGATGAGTATCCAAATGGGAGTCAATGAGTGTGTTGTTTCCCATGTATCATCGCGGGAATCTTC		
Klasse II			
Klon	Sequenz		
4	GGGGCGACGTTCTATGAGGCGCCTCATGATGTCGTCATGTCGCACGAGCGGACGTTGTTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGTCTTACTCATTATGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG	2.1 ± 0.3	
7	GGGGCGACGTTCTATGAGGCGCCTCATGATGTCGTCATGTCGCACGAGCGGACGTTGTTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGTTTACTCATTATGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG		
15	GGGGCGACGTTCTATGAGGCGCCTCATGATGTCGTCATGTCGCACGAGCGGACGTTGTTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGTCTTACTCATTATGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG		
16	GGGGCGACGTTCTATGAGGCGCCTCATGATGTCGTCATGTCGCACGAGCGGACGTTGTTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGTTTACTCATTATGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG		
19	GGGGCGACGTTCTATGAGGCGCCTCATGATGTCGTCATGTCGCACGAGCGGACGTTGTTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGTTTACTCATTATGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG		
26	GGGGCGACGTTCTATGAGGCGCCTCATGATGTCGTCATGTCGCACGAGCGGACGTTGTTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGTTTACTCATTATGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG	2.9 ± 0.2	
27	GGGGCGACGTTCTATGAGGCGCCTCATGATGTCGTCATGTCGCACGAGCGGACGTTGTTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGTTTACTCATTATGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG		
30	GGGGCGACGTTCTATGAGGCGCCTCATGATGTCGTCATGTCGCACGAGCGGACGTTGTTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGTTTACTCATTATGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG		
33	GGGGCGACGTTCTATGAGGCGCCTCATGATGTCGTCATGTCGCACGAGCGGACGTTGTTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGTTTACTCATTATGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG		
35	GGGGCGACGTTCTATGAGGCGCCTCATGATGTCGTCATGTCGCACGAGCGGACGTTGTTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGTTTACTCATTATGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG		
Klasse III			
Klon	Sequenz		
5	CTATTGTGTCCTTTGCGGCGAGCGGAGTAGATGTCATCTGCGGCCCTTCGTGTTAAGGAGTATTCATTTTCCAGTCTGTGACGCGGAGAGTAGCTGTTACGATTGTTACTCCCGAGTCGGG	1.8 ± 0.4	
11	CTATTGTGTCCTTTGCGGCGAGCGGAGTAGATGTCATCTGCGGCCCTTCGTGTTAAGGAGTATTCATTTTCCAGTCTGTGACGCGGAGAGTAGCTGTTACGATTGTTACTCCCGAGTCGGG		
24	CTATTGTGTCCTTTGCGGCGAGCGGAGTAGATGTCATCTGCGGCCCTTCGTGTTAAGGAGTATTCATTTTCCAGTCTGTGACGCGGAGAGTAGCTGTTACGATTGTTACTCCCGAGTCGGG		
31	CTATTGTGTCCTTTGCGGCGAGCGGAGTAGATGTCATCTGCGGCCCTTCGTGTTAAGGAGTATTCATTTTCCAGTCTGTGACGCGGAGAGTAGCTGTTACGATTGTTACTCCCGAGTCGGG		
32	CTATTGTGTCCTTTGCGGCGAGCGGAGTAGATGTCATCTGCGGCCCTTCGTGTTAAGGAGTATTCATTTTCCAGTCTGTGACGCGGAGAGTAGCTGTTACGATTGTTACTCCCGAGTCGGG		



**Fig. 4**

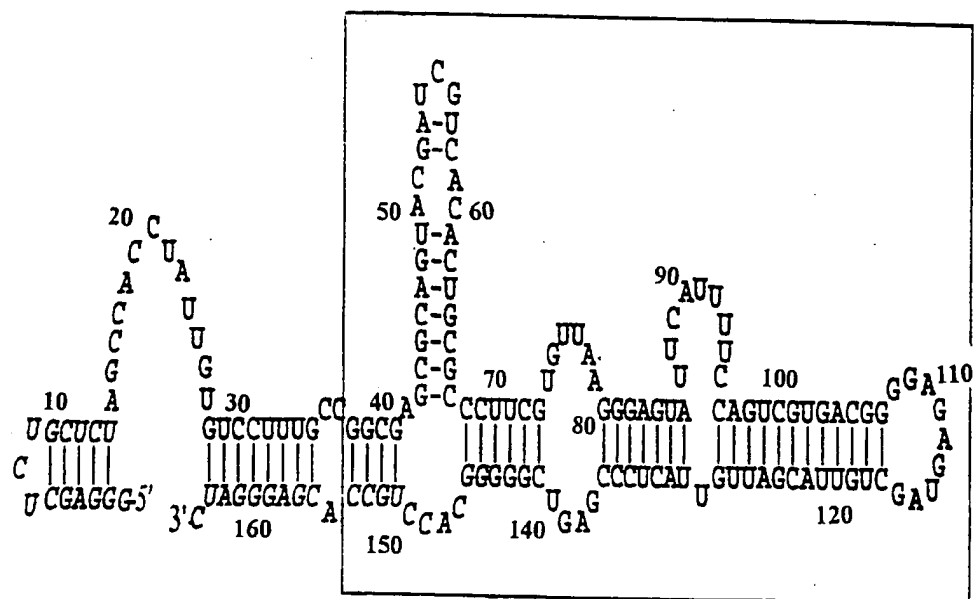
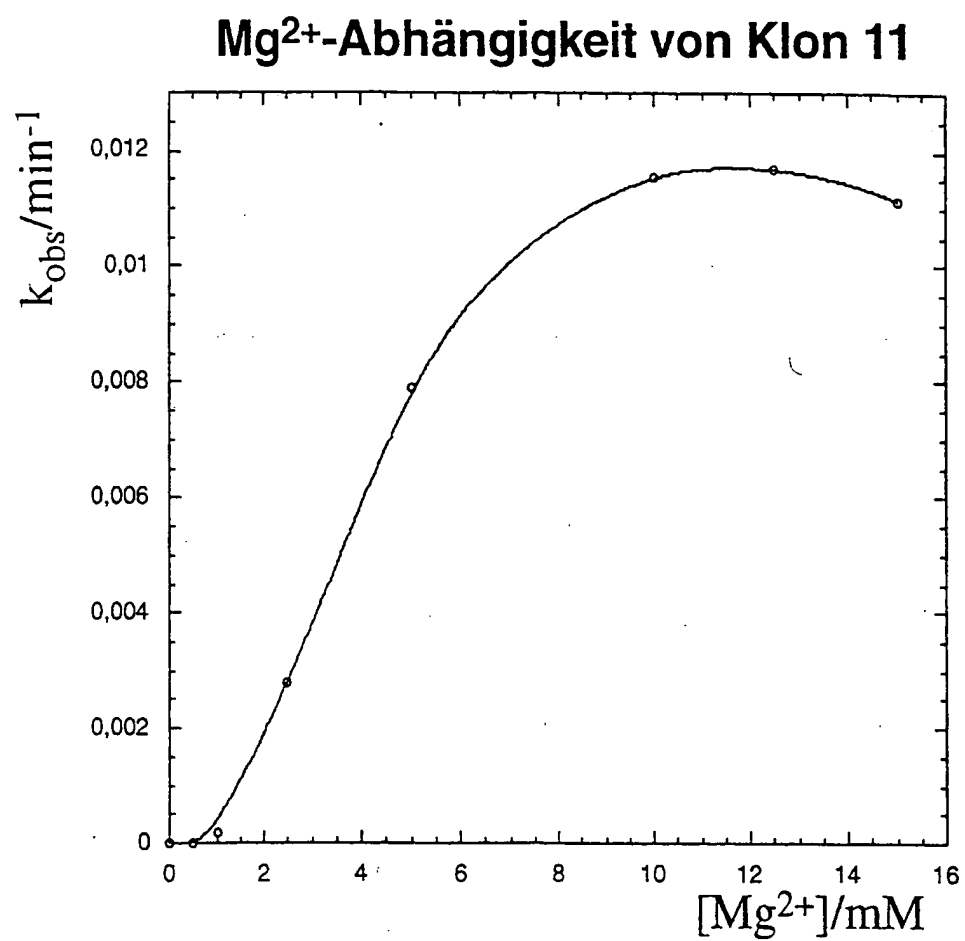


Fig. 5



**Fig. 6(a)**

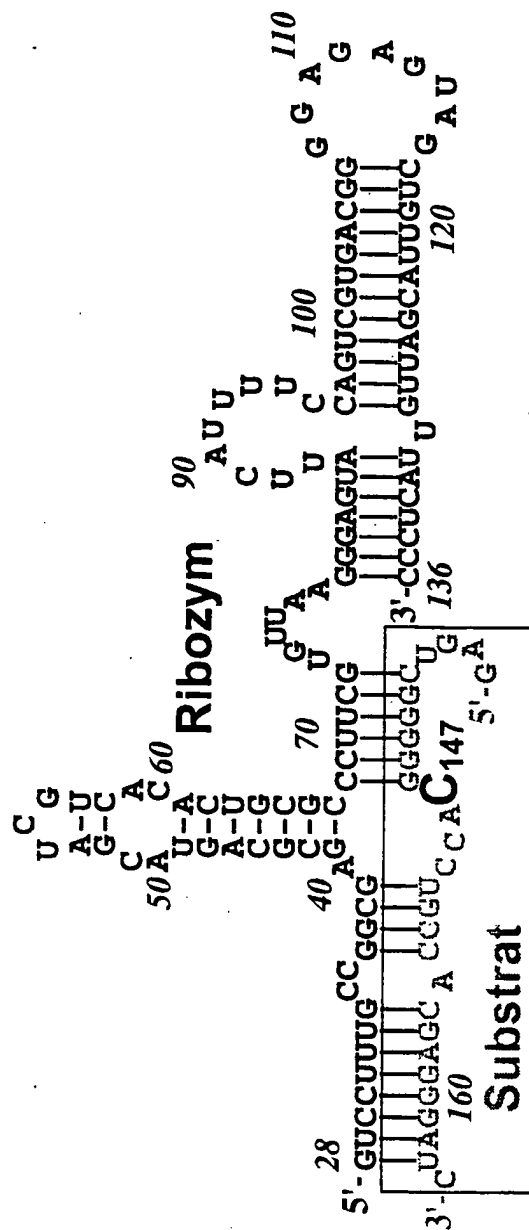
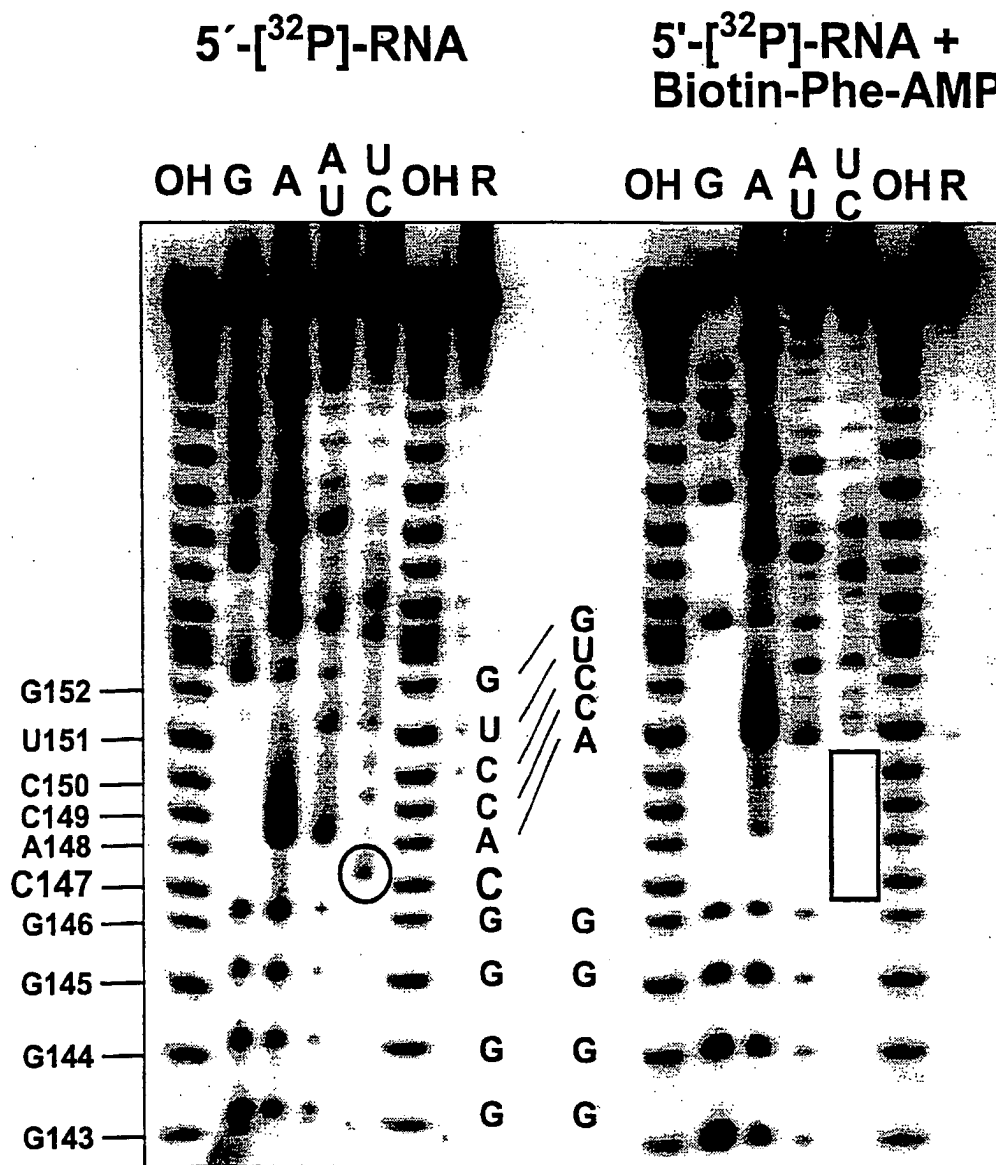


Fig. 6(b)



Best Available Copy

Fig. 7

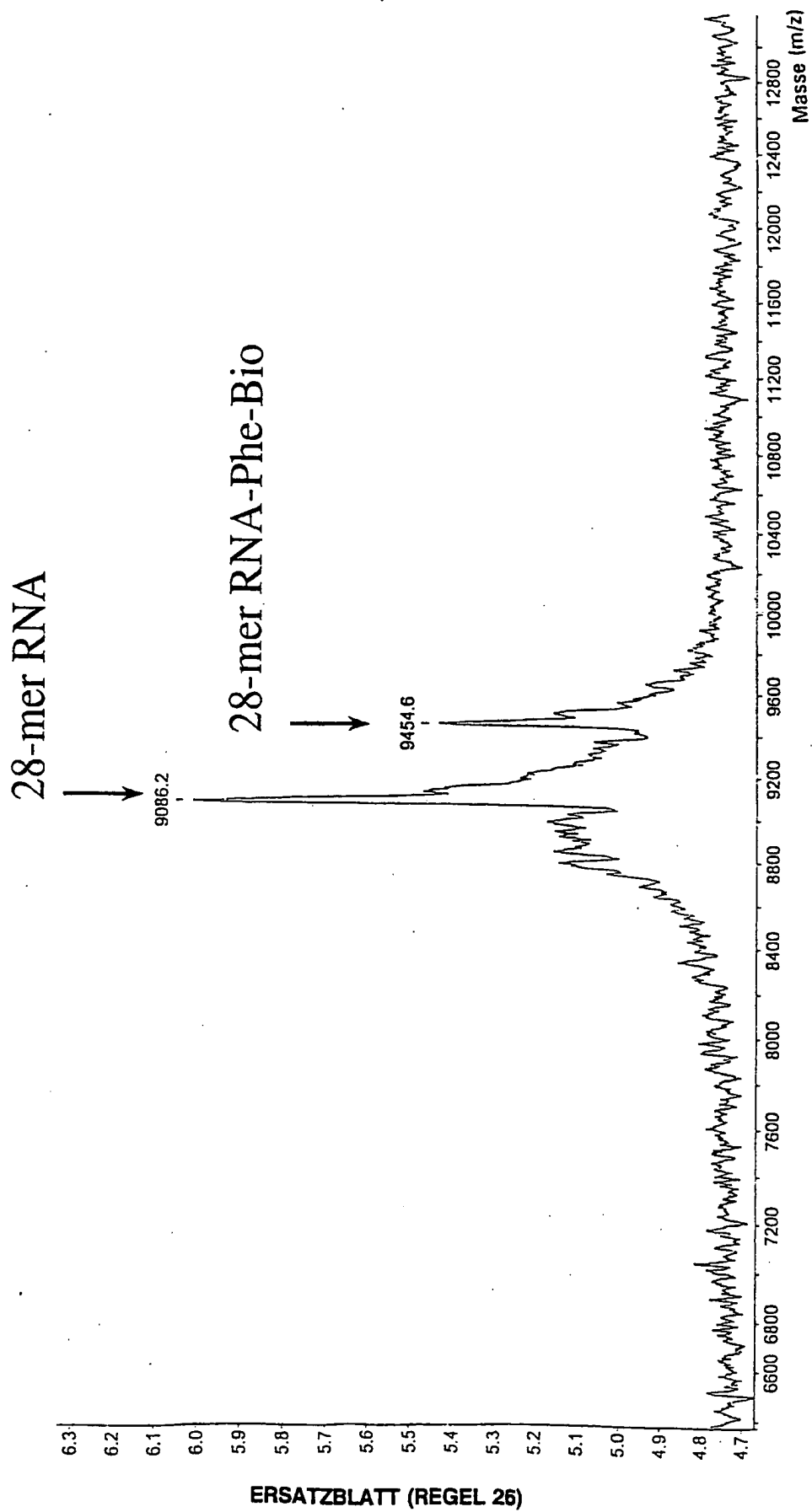


Fig. 8

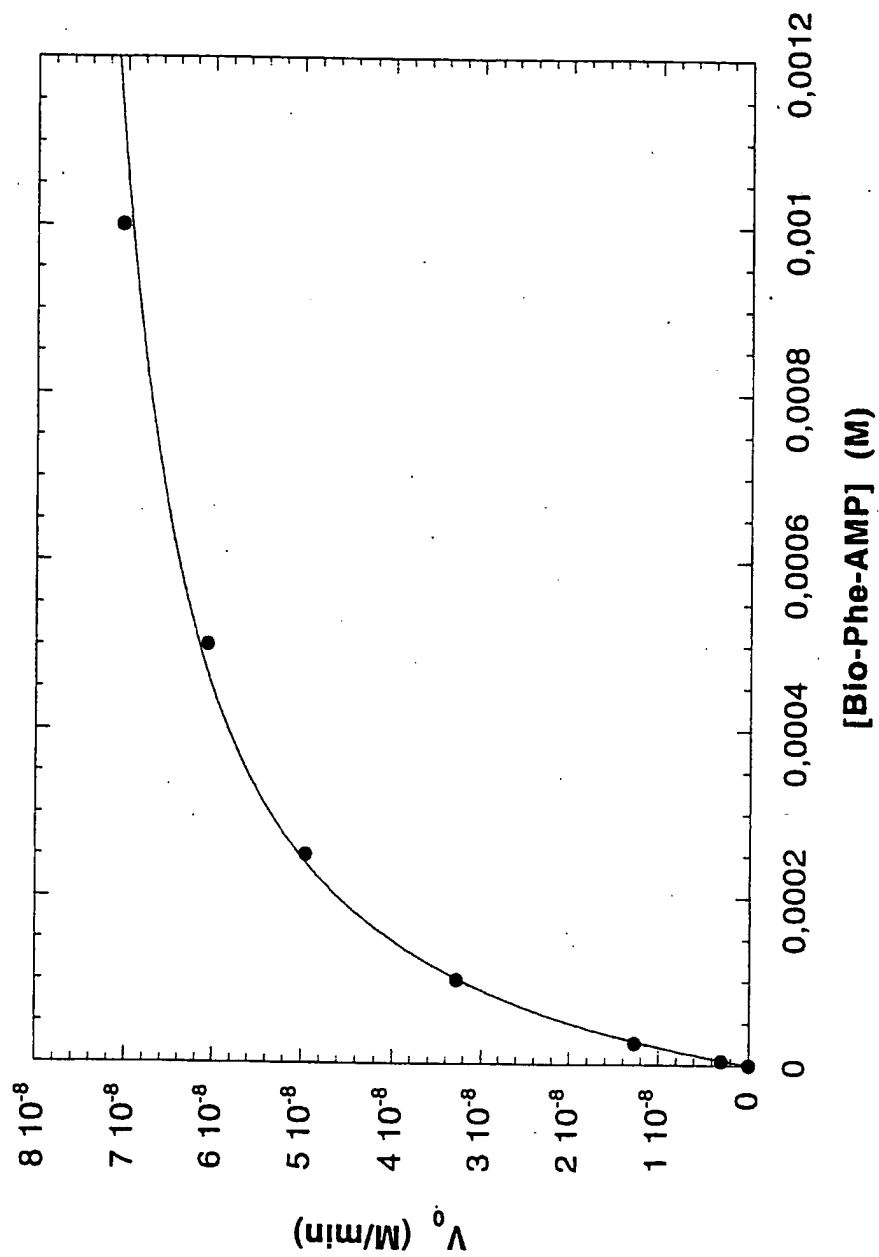


Fig. 8 (inset)

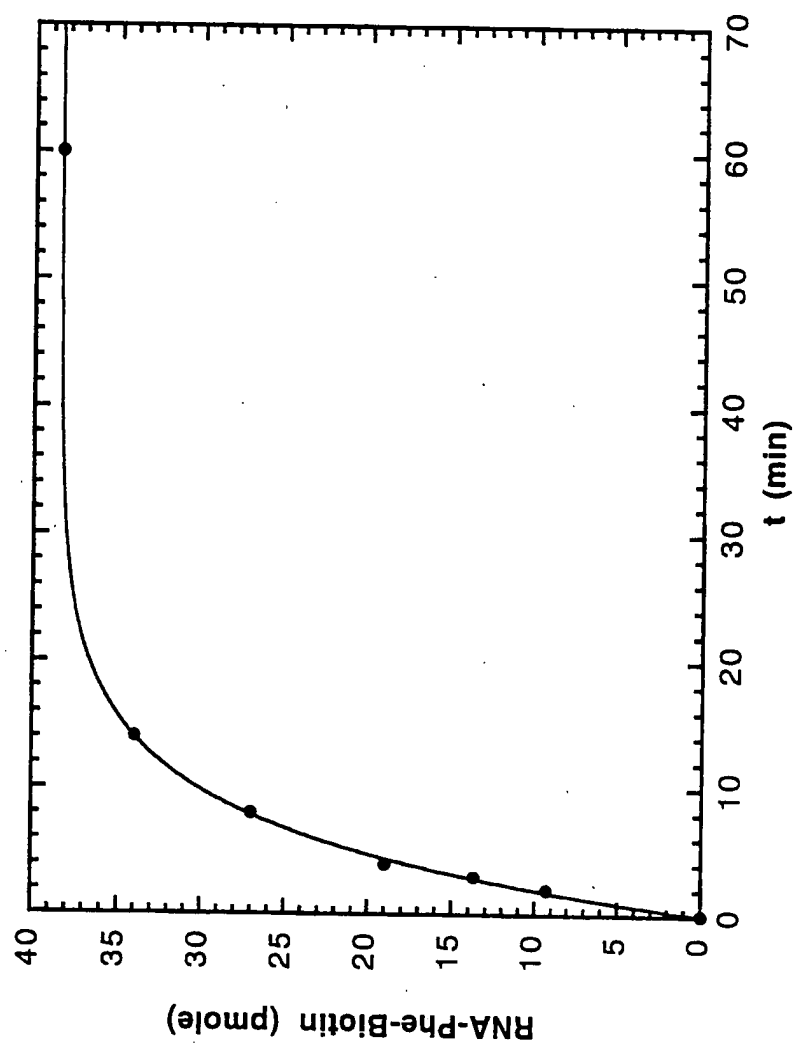
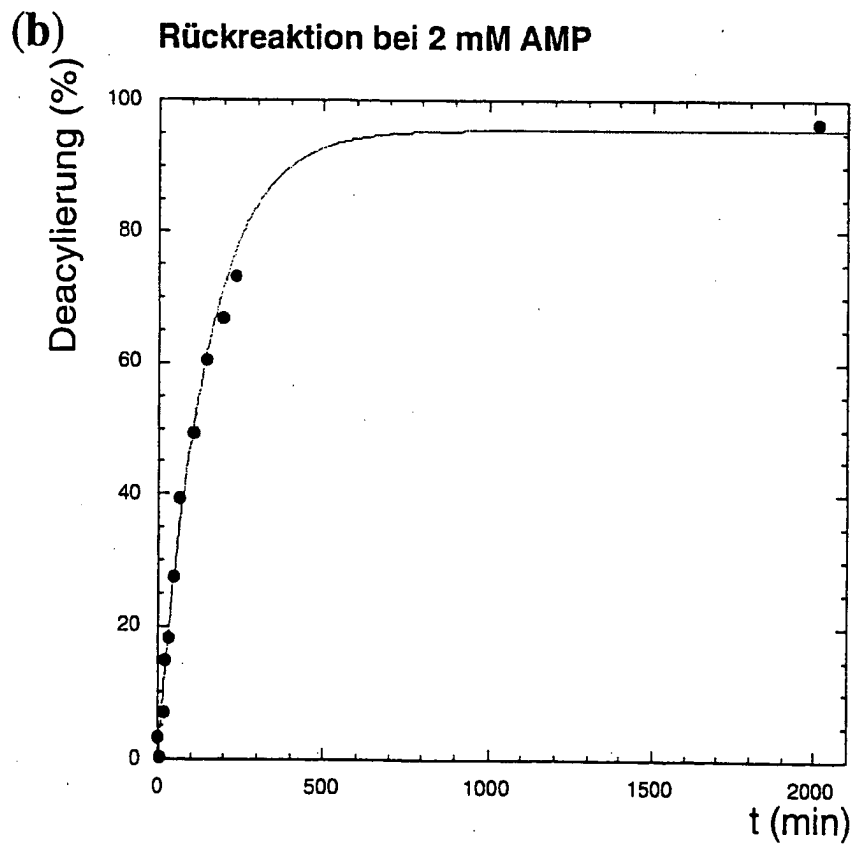
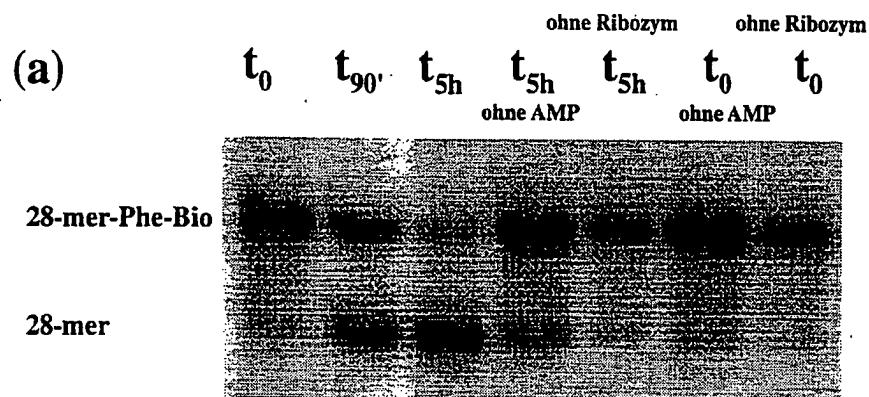


Fig. 9

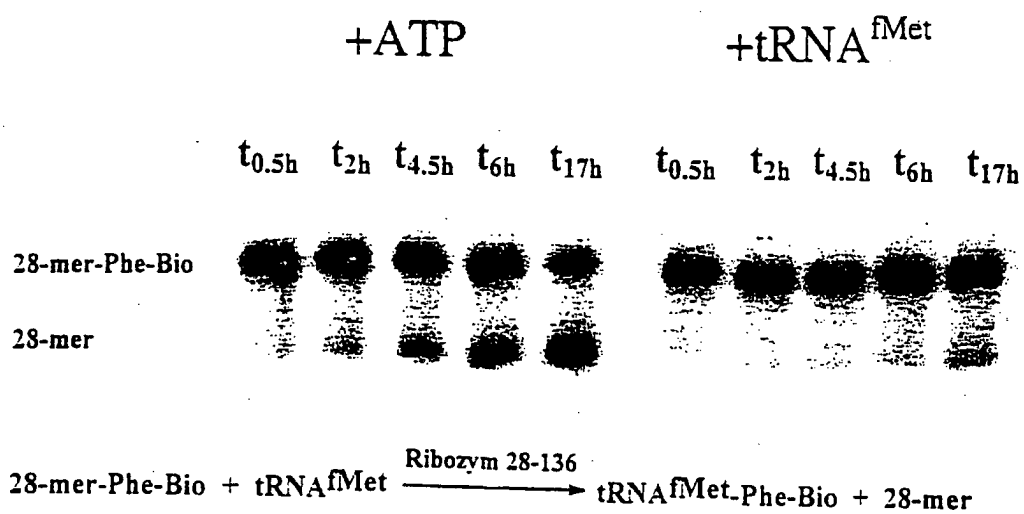


Best Available Copy



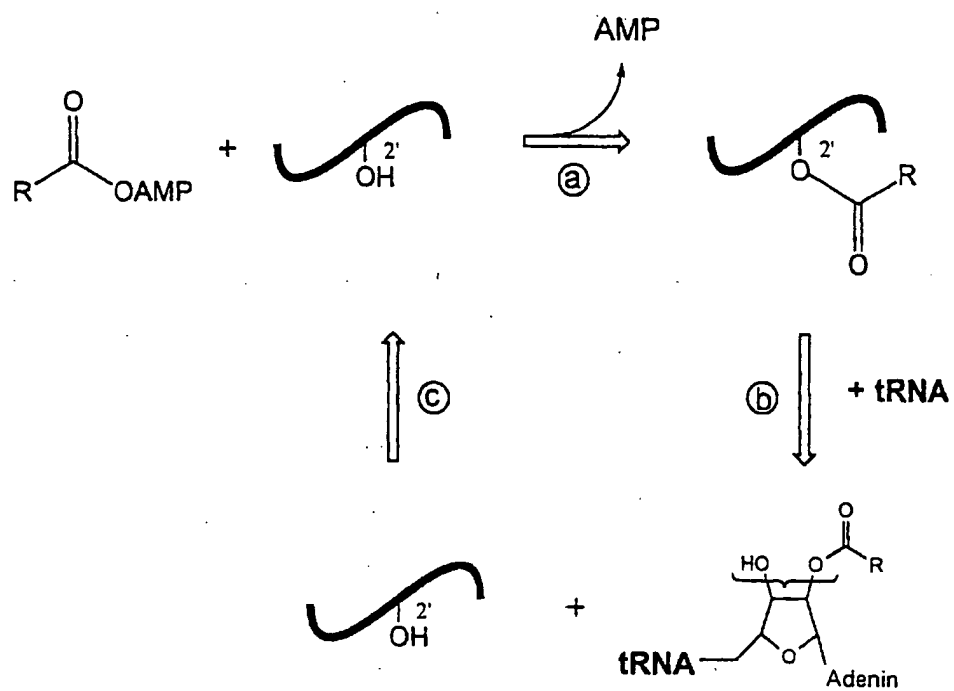
12/13

Fig. 10



Best Available Copy

Fig. 11

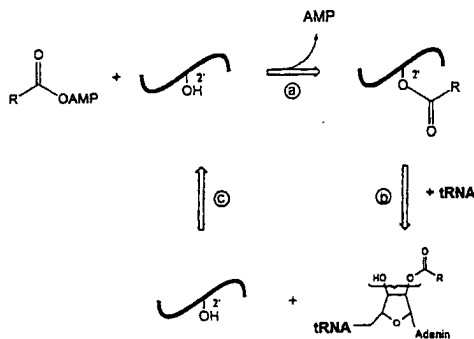


**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/11, C12Q 1/68, C12N 9/00, 15/86, A61K 31/70 // C12N 15/52</b>	<b>A3</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/36517</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juli 1999 (22.07.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00181 (22) Internationales Anmeldedatum: 14. Januar 1999 (14.01.99)  (30) Prioritätsdaten: 198 01 153.9 14. Januar 1998 (14.01.98) DE  (71)(72) Anmelder und Erfinder: JENNE, Andreas [DE/DE]; Angerweg 12, D-83253 Rimsting (DE).  (74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: IL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>  (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 23. September 1999 (23.09.99)	

(54) Title: METHOD FOR SELECTING RIBOZYMES WHICH ARE CAPABLE OF COVALENTLY MODIFYING THE RIBONUCLEIC ACIDS ON 2'-OH-GROUPS IN TRANS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SELEKTION VON RIBOZYMEN, DIE RIBONUCLEINSÄUREN IN TRANS AN 2'-OH-GRUPPEN KOVALENT MODIFIZIEREN KÖNNEN



## (57) Abstract

The invention relates to an in vitro selection method for selecting ribozymes which are capable of covalently modifying the ribonucleic acids on 2'-OH-groups in trans and to the ribozymes obtained using this method. The invention also relates to medicaments containing said ribozymes, said medicaments being preferably used for inhibiting gene expression - for example in gene therapy. The inventive ribozymes can also be used for producing muteins and nuclease-resistant ribonucleic acids, for example ribonuclease-resistant "antisense" oligonucleotides.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein in vitro-Selektionsverfahren, mit dem Ribozyme selektiert werden können, die 2'-OH-Gruppen von Ribonucleinsäuren in trans kovalent modifizieren können. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Ribozyme, die durch dieses Verfahren erhältlich sind. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung diese enthaltende Arzneimittel, die vorzugsweise zur Hemmung der Genexpression – beispielsweise in der Gentherapie – verwendet werden können. Die erfindungsgemäßen Ribozyme können darüber hinaus zur Herstellung von Muteinen und nucleaseresistenten Ribonucleinsäuren – beispielsweise ribonucleaseresistenten "Antisense"-Oligonucleotide – verwendet werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/00181

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/11 C12Q1/68 C12N9/00 C12N15/86 A61K31/70 //C12N15/52		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ILLANGASEKARE M ET AL: "AMINOACYL-RNA SYNTHESIS CATALYZED BY AN RNA" SCIENCE, vol. 267, 3 February 1995 (1995-02-03), pages 643-647, XP002044710 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-22
A	LORSCH J R ET AL: "IN VITRO EVOLUTION OF NEW RIBOZYMES WITH POLYNUCLEOTIDE KINASE ACTIVITY" NATURE, vol. 371, 1 September 1994 (1994-09-01), pages 31-36, XP002044711 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document	1-22
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  20 July 1999		Date of mailing of the international search report  03/08/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Andres, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/00181

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>IBBA M : "STRATEGIES FOR IN-VITRO AND IN-VIVO TRANSLATION WITH NON-NATURAL AMINO-ACIDS" BIOTECHNOLOGY &amp; GENETIC ENGINEERING REVIEWS, (1996) VOL. 13, PP. 197-216., XP002109693 page 204 - page 210 ----</p>	21,22
A	<p>PAN, T.: "Novel and variant ribozymes obtained through in vitro selection" CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, vol. 1, 1997, pages 17-25, XP002109694 page 21 - page 22 ----</p>	1
A	<p>HAGER, A. ET AL.: "Ribozymes : aiming at RNA replication and protein synthesis" CHEMISTRY AND BIOLOGY., vol. 3, September 1996 (1996-09), pages 717-725, XP002104957 ISSN: 1074-5521 page 722, right-hand column, paragraph 3 - page 723, right-hand column, line 19 ----</p>	1
P,X	<p>JENNE A ET AL: "A novel ribozyme with ester transferase activity" CHEMISTRY &amp; BIOLOGY, VOL. 5, NO. 1, PP. 23-34., 15 January 1998 (1998-01-15), XP002109695 the whole document -----</p>	1-14

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00181

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 6 C12N15/11 C12Q1/68 C12N9/00 C12N15/86 A61K31/70 //C12N15/52		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ILLANGASEKARE M ET AL: "AMINOACYL-RNA SYNTHESIS CATALYZED BY AN RNA" SCIENCE, Bd. 267, 3. Februar 1995 (1995-02-03), Seiten 643-647, XP002044710 ISSN: 0036-8075 das ganze Dokument	1-22
A	LORSCH J R ET AL: "IN VITRO EVOLUTION OF NEW RIBOZYMES WITH POLYNUCLEOTIDE KINASE ACTIVITY" NATURE, Bd. 371, 1. September 1994 (1994-09-01), Seiten 31-36, XP002044711 ISSN: 0028-0836 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-22
--- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 20. Juli 1999		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 03/08/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Andres, S

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00181

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>IBBA M : "STRATEGIES FOR IN-VITRO AND IN-VIVO TRANSLATION WITH NON-NATURAL AMINO-ACIDS"</p> <p>BIOTECHNOLOGY &amp; GENETIC ENGINEERING REVIEWS, (1996) VOL. 13, PP. 197-216., XP002109693</p> <p>Seite 204 - Seite 210</p> <p>---</p>	21,22
A	<p>PAN, T.: "Novel and variant ribozymes obtained through in vitro selection"</p> <p>CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, Bd. 1, 1997, Seiten 17-25, XP002109694</p> <p>Seite 21 - Seite 22</p> <p>---</p>	1
A	<p>HAGER, A. ET AL.: "Ribozymes : aiming at RNA replication and protein synthesis"</p> <p>CHEMISTRY AND BIOLOGY., Bd. 3, September 1996 (1996-09), Seiten 717-725, XP002104957</p> <p>ISSN: 1074-5521</p> <p>Seite 722, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 723, rechte Spalte, Zeile 19</p> <p>---</p>	1
P,X	<p>JENNE A ET AL: "A novel ribozyme with ester transferase activity"</p> <p>CHEMISTRY &amp; BIOLOGY, VOL. 5, NO. 1, PP. 23-34., 15. Januar 1998 (1998-01-15), XP002109695</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-14